

43888-092

Dec. 28, 2000

KOWAMURA

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

McDermott, Will & Emery

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 4月25日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-124904

出 願 人

Applicant(s):

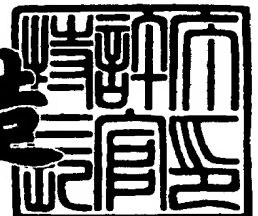
松下電器産業株式会社



2000年11月10日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3094217

【書類名】 特許願

【整理番号】 2032620010

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/493

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地 松下電器産業株式会社内

【氏名】 河村 達朗

【特許出願人】

【識別番号】 000005821

【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地

【氏名又は名称】 松下電器産業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100072431

【弁理士】

【氏名又は名称】 石井 和郎

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成11年特許願第374752号

【出願日】 平成11年12月28日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 066936

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9905716

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 タンパク質濃度計測用試薬、これを用いたタンパク質濃度計測方法および尿検査方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 タンニン、タンニン酸および m-ガロイル没食子酸からなる群より選ばれた試薬を混入する前後の被検溶液の透過光強度および散乱光強度の少なくとも一方を計測し、それらの計測値にもとづいて前記被検溶液中のタンパク質濃度を求めることを特徴とするタンパク質濃度の計測方法。

【請求項 2】 前記試薬混入後の被検溶液の pH を 1.5～5.8 に調整した後、透過光強度および散乱光強度の少なくとも一方を計測する請求項 1 記載のタンパク質濃度の計測方法。

【請求項 3】 前記被検溶液に、フタル酸水素カリウム、酢酸、クエン酸、およびアスコルビン酸からなる群より選ばれた pH 調整剤を添加して pH を調整する請求項 2 記載のタンパク質濃度の計測方法。

【請求項 4】 前記試薬混入後の被検溶液の試薬濃度が $5 \times 10^{-3} \sim 5 \text{ g/dl}$ の範囲にある請求項 1～3 のいずれかに記載のタンパク質濃度の計測方法。

【請求項 5】 前記透過光強度および散乱光強度の計測値にもとづいて前記被検溶液中のタンパク質濃度を求める請求項 1～4 のいずれかに記載のタンパク質濃度の計測方法。

【請求項 6】 前記散乱光強度の計測値から、低濃度域の被検溶液中のタンパク質濃度を決定し、前記透過光強度の計測値から、高濃度域の被検溶液中のタンパク質濃度を決定する請求項 5 記載のタンパク質濃度の計測方法。

【請求項 7】 前記透過光強度の計測値と前記散乱光強度の計測値とを照合することにより、被検溶液中の浮遊粒子および泡による誤計測の有無を検知する請求項 5 または 6 記載のタンパク質濃度の計測方法。

【請求項 8】 被検溶液が尿である請求項 1～7 のいずれかに記載のタンパク質濃度の計測方法を用いる尿検査方法。

【請求項 9】 タンニン、タンニン酸および m-ガロイル没食子酸からなる群より選ばれた試薬を混入する前後の被検溶液の透過光強度および散乱光強度の

少なくとも一方を計測する工程、および前記試薬混入前の前記被検溶液の旋光度を計測する工程を有し、前記透過光強度および散乱光強度の少なくとも一方の計測値にもとづいて前記被検溶液中のタンパク質濃度を求めるとともに、前記タンパク質濃度と前記旋光度とから前記タンパク質以外の旋光性物質の濃度を決定することを特徴とする溶液濃度の計測方法。

【請求項 1 0】 前記試薬混入後の被検溶液の pH を 1. 5 ～ 5. 8 に調整した後、透過光強度および散乱光強度の少なくとも一方を計測する請求項 9 記載の溶液濃度の計測方法。

【請求項 1 1】 前記被検溶液にフタル酸水素カリウム、酢酸、クエン酸、およびアスコルビン酸からなる群より選ばれた pH 調整剤を混入して、前記被検溶液の pH を調整する請求項 9 または 1 0 記載の溶液濃度の計測方法。

【請求項 1 2】 前記試薬混入後の被検溶液の試薬濃度が $5 \times 10^{-3} \sim 5 \text{ g/dl}$ の範囲にある請求項 9 ～ 1 1 のいずれかに記載の溶液濃度の計測方法。

【請求項 1 3】 被検溶液が尿であり、タンパク質以外の旋光性物質がグルコースである請求項 9 ～ 1 2 のいずれかに記載の溶液濃度の計測方法を用いる尿検査方法。

【請求項 1 4】 前記被検溶液の透過光強度、散乱光強度または旋光度の計測に使用する波長が、500 nm 以上である請求項 8 または 1 3 記載の尿検査方法。

【請求項 1 5】 被検溶液に試薬を混入し、生じた濁度からタンパク質濃度を計測する方法に使用する試薬で、タンニンを含むことを特徴とするタンパク質濃度の計測用試薬。

【請求項 1 6】 被検溶液に試薬を混入し、生じた濁度からタンパク質濃度を計測する方法に使用する試薬で、タンニン酸を含むことを特徴とするタンパク質濃度の計測用試薬。

【請求項 1 7】 被検溶液に試薬を混入し、生じた濁度からタンパク質濃度を計測する方法に使用する試薬で、m-ガロイル没食子酸を含むことを特徴とするタンパク質濃度の計測用試薬。

【請求項 1 8】 pH が 1. 5 ～ 5. 8 に調整された請求項 1 5 ～ 1 7 のい

いずれかに記載のタンパク質濃度の計測用試薬。

【請求項 1 9】 p H 調整剤として、フタル酸水素カリウム、酢酸、クエン酸、およびアスコルビン酸からなる群より選ばれた酸を含む請求項 1 8 記載のタンパク質濃度の計測用試薬。

【請求項 2 0】 前記試薬が水に溶解された水溶液である請求項 1 5 ～ 1 9 のいずれかに記載のタンパク質濃度の計測用試薬。

【請求項 2 1】 前記水溶液中の試薬の濃度が 2 5 0 g / d l 以下である請求項 2 0 記載のタンパク質濃度の計測用試薬。

【請求項 2 2】 前記 p H 調整剤の濃度が、前記試薬の使用温度範囲において析出しない範囲において最も高い請求項 1 8 ～ 2 1 のいずれかに記載のタンパク質濃度の計測用試薬。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、被検溶液中に溶解している溶質の濃度、特にタンパク質濃度および旋光性物質の濃度を計測する方法に関するものである。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

従来のタンパク質濃度の計測方式としては、被検溶液にトリクロロ酢酸を混入してタンパク質を凝集させることにより溶液を混濁させ、その濁度からタンパク質濃度を求める方法がある。ただし、この方式は、2 5 ℃ 以上では、安定的に被検溶液を混濁させることが難しい。そのため、通常の家計における環境温度である 2 5 ～ 4 0 ℃ 程度までにおいては、計測が不可能なことがある。

また、尿検査装置としては、試薬を含浸した試験紙などに尿を浸し、その呈色反応を分光器などによって観測し、尿の成分を検査するものがある。ここで使用される試験紙は、グルコース、タンパク質等の個々の検査項目に応じてそれぞれ用意されている。

【 0 0 0 3 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記の問題を解決して、通常の家計における環境温度である 0 ～ 4 0 ℃ 程度の範囲で信頼性が高く、維持管理が容易なタンパク質濃度の計測方法およびそれに使用する試薬を提供することを目的とする。

また、本発明は、簡便で高精度な尿検査を可能にする方法を提供することを目的とする。

【 0 0 0 4 】

【課題を解決するための手段】

上記の課題を解決するため本発明のタンパク質濃度の計測方法は、タンパク質のみの光学特性を変化させる試薬として、タンニン、タンニン酸、および m - ガロイル没食子酸からなる群より選ばれたものを使用することを特徴とする。

さらに、本発明のタンパク質濃度の計測方法は、被検溶液に p H 調整剤を添加し、その p H を 1 . 5 ～ 5 . 8 に調整することも特徴とする。

【 0 0 0 5 】

本発明のタンパク質濃度の計測方法は、前記の試薬を混入する前後の被検溶液の透過光強度および散乱光強度の少なくとも一方を計測し、それらの計測値にもとづいて前記被検溶液中のタンパク質濃度を求める。

ここにおいて、前記散乱光強度の計測値から低濃度域の被検溶液中のタンパク質濃度を決定し、前記透過光強度の計測値から高濃度域の被検溶液中のタンパク質濃度を決定することが好ましい。

前記透過光強度の計測値と前記散乱光強度の計測値とを照合することにより、被検溶液中の浮遊粒子、泡等による誤計測の有無を検知することができる。

【 0 0 0 6 】

さらに、本発明は、前記試薬を混入する前後の被検溶液の透過光強度および散乱光強度の少なくとも一方を計測する工程、および前記試薬混入前の前記被検溶液の旋光度を計測する工程を有し、前記透過光強度および散乱光強度の少なくとも一方の計測値にもとづいて前記被検溶液中のタンパク質濃度を求めるとともに、前記タンパク質濃度と前記旋光度とから前記タンパク質以外の旋光性物質の濃度を決定する溶液濃度の計測方法を提供する。

この溶液濃度の計測方法は、上記タンパク質濃度の計測方法の原理と同様の原

理を用いるものである。したがって、試薬として、タンニン、タンニン酸、および *m*-ガロイル没食子酸からなる群より選ばれたものを使用する。また、被検溶液の pH の調整も同様に行うのが好ましい。

【0007】

【発明の実施の形態】

本発明のタンパク質濃度の計測に用いる試薬タンニンは、広く植物界に分布する多数のフェノール性ヒドロキシル基をもつ複雑な芳香族化合物の総称（東京化学同人発行の化学辞典）であり、分子量が 600-2000 ぐらい（共立出版発行の化学大辞典）である。

タンニン酸は、式 $C_{76}H_{52}O_{46}$ で表され、CAS 登録番号が 1401-55-4 の物質である。また、*m*-ガロイル没食子酸は式 $C_{14}H_{10}O_9$ で表され、CAS 登録番号が 536-08-3 の物質である。

【0008】

これらの試薬は、被検溶液中のタンパク質と反応して濁りを生じ、そのタンパク質濃度に対応した度合いの濁度を引き起こす。このような試薬を被検溶液に混入させることにより、被検溶液のタンパク質濃度を計測することができる。例えば、尿を被検溶液とした場合には、試薬を混入してタンパク質成分を凝集させることにより光学特性を変化させ、試薬混入前後の散乱光強度の差（試薬混入後の散乱光強度－試薬混入前の散乱光強度）および／または試薬混入前後の透過光強度の比（試薬混入後の透過光強度／試薬混入前の透過光強度）から、被検溶液中のタンパク質濃度を求めることができる。

【0009】

但し、タンパク質濃度が高い（おおむね 250～500 mg/dl 以上）場合においては、タンパク質が凝集しない、またはその濃度に応じた凝集をしない場合があった。このような場合は、全く混濁しない、またはその濃度に応じた濁度が発生しないため、濃度を計測できないことがあった。このように、濃度が計測できない場合においても、pH 調整剤を被検溶液に混入して、混入後の前記被検溶液の pH を 1.5～5.8 にすることで、混濁させることができる。

なお、本発明において用いる前述の試薬は、それ自体が pH 調整剤としての働

きをする場合があるため、かかる場合には別途 pH 調整剤を添加しなくてもよい。

これによって、タンパク質濃度が高い場合においても、その濃度に応じた濁度が発生するため、タンパク質濃度が計測できる。被検溶液が尿の場合、この試薬または／および被検溶液に混入する酸として、フタル酸水素カリウム、酢酸、クエン酸、およびアスコルビン酸からなる群より選ぶと、適度な緩衝能が得やすく、低コストでかつ扱いやすく、更にリン酸塩、炭酸塩等の析出を誘発する可能性が低く、特に実用的である。

【 0 0 1 0 】

本発明によるタンパク質濃度の計測方法により、尿を始めとする髄液、血清、血漿、唾液などの体液や、乳製品、酒、食酢などの食品、培養液などの産業用液、および人工透析液やその廃液などの被検溶液中に含まれるタンパク質濃度を求めることができる。

また、被検溶液の旋光度を計測した後、前記試薬を混入してタンパク質濃度を計測することにより、タンパク質の濃度とグルコースなどのタンパク質以外の旋光性物質を同時に決定することができる。

【 0 0 1 1 】

すなわち、本発明は、タンニン、タンニン酸および m-ガロイル没食子酸からなる群より選ばれた試薬を混入する前後の被検溶液の透過光強度および散乱光強度の少なくとも一方を計測する工程、および前記試薬混入前の前記被検溶液の旋光度を計測する工程を有し、前記透過光強度および散乱光強度の少なくとも一方の計測値にもとづいて前記被検溶液中のタンパク質濃度を求めるとともに、前記タンパク質濃度と前記旋光度とから前記タンパク質以外の旋光性物質の濃度を決定することを特徴とする溶液濃度の計測方法にも関する。

このように本発明は、尿を被検溶液として尿タンパク濃度や尿糖値を測定して検査する場合に特に有用であり、検査の信頼性や精度を向上させ、検査工程を大幅に簡略化することができる。

【 0 0 1 2 】

さらに、本発明は、被検溶液に試薬を混入し、生じた濁度からタンパク質濃度

を計測する方法に使用する試薬で、タンニン、タンニン酸または m -ガロイル没食子酸を含むことを特徴とするタンパク質濃度の計測用試薬に関する。

上述のように、この試薬は pH が $1.5 \sim 5.8$ に調整するのが好ましく、 pH 調整剤としては、フタル酸水素カリウム、酢酸、クエン酸、およびアスコルビン酸からなる群より選ばれた酸を含むのが有効である。

したがって、前記試薬は水に溶解された水溶液として用いるのが好ましい。そして、前記水溶液中の試薬の濃度が 250 g/dl 以下であるのが好ましい。

さらに、前記 pH 調整剤の濃度は、前記試薬の使用温度範囲において pH 調整剤が析出しない範囲において最も高く設定するのが好ましい。

以下に、本発明の実施の形態を、図面を参照しながらより具体的に説明する。ただし、本発明は、これらのみに限定されるものではない。

【0013】

《実施の形態1》

濃度 $=1\text{ g/dl}$ のタンニン水溶液を被検溶液に容量比 $1:1$ の比率で混入してタンパク質を凝集させることにより被検溶液を混濁させ、その散乱光強度を計測し、この計測値から被検溶液中のタンパク質濃度を求める例について、図1を用いて詳細に説明する。

図1は、本発明のタンパク質濃度の計測方法に使用する装置の概略構成を示す側面図であり、図2はその光学系を示す平面図である。これらの図において、1は半導体レーザモジュールからなる光源を示し、波長 780 nm 、強度 3.0 mW 、ビーム直径 2.0 mm の略平行光2を投射する。サンプルセル3は、ガラス製で、上部に開放された開口部を有し、底面が $10 \times 10\text{ mm}$ 、高さが 50 mm の直方体状容器であり、側面は透明な光学窓である。このサンプルセル3は、その内部に收容された被検溶液に略平行光2を照射することができ、また、透過光および散乱光7を外部に取り出すことができる。被検溶液を透過した光を検知する光センサー4および被検溶液中を光が伝搬する際に発生した散乱光7を検知する光センサー5により、それぞれ透過光および散乱光が検知される。コンピューター6は、光源1を制御するとともに、光センサー4および5の出力信号を解析する。

【0014】

上記の計測装置を用いて、タンパク質水溶液を被検溶液としてタンパク質濃度を計測する手順を以下に説明する。なお、以下の操作は気温約40℃の部屋で実施され、被検溶液、試薬および計測装置とも約40℃の状態にあった。

まず、被検溶液1mlをビーカー等に入れ、濃度1g/dlのタンニン水溶液1mlをこのビーカーに入れ、攪拌する。次に、この混合溶液をサンプルセル3へ導入する。コンピューター6が光源1を動作させ、同時に光センサー4および5の出力信号の計測する。

被検溶液にタンニン水溶液試薬が混入されると、タンパク質成分が凝集して被検溶液が濁り、透過光強度が低下し、散乱光強度が増加する。この時の光センサー4および5のそれぞれの出力信号の計測値を解析することにより、タンパク質濃度を求める。

【0015】

あらかじめ濃度が0、2、5、15、30、60、100mg/dlのタンパク質（血清アルブミン）水溶液を作成した。これら被検溶液を用い、上記の方法で散乱光強度および透過光強度、即ち、光センサー5および4の出力信号を計測した。それらの結果をそれぞれ図3および図4に示す。図3においては、タンパク質濃度を横軸に、散乱光強度を縦軸（光センサー5の出力信号）に示した。図4においては、タンパク質濃度を横軸に、透過光強度を縦軸（光センサー4の出力信号）に示した。なお、これらすべての被検溶液は、タンニン水溶液試薬と混入される前は、水と同程度に透明であり、透過光強度と散乱光強度は水と同じであった。また、濃度=0即ち水の場合、タンニン水溶液試薬の混入前後における透過光強度と散乱光強度の変化は観測できず、実質的に透明であった。

【0016】

図3において、各実測値をスムーズに結んで実線で示し、散乱光強度が濃度に対して直線的に変化しているタンパク質濃度0～15mg/dlの領域の実測値を結んだ直線を延長させて点線で示した。この実線と点線から明らかなように、タンパク質濃度が約15mg/dlまでは実線と点線が重なり、散乱光強度はタンパク質濃度に比例している。しかし、これより高濃度になるにつれて、次第に

比例関係よりも低い実測値を示している。これは、タンパク質濃度が高くなり、光が散乱される確率が高くなると、散乱光が発生した地点からサンプルセルの外まで伝搬する際に、再び散乱される確率も高くなり、光センサー 5 に散乱光が到達する確率が低下するからである。従って、散乱光強度の変化から濃度を算出する場合には、直線性が確保できる低濃度域（約 15 mg/dl 以下）において、より高精度な濃度を求めることができる。

【0017】

図 4 において、横軸はタンパク質濃度を、縦軸（対数表示）は透過光強度を示す。各実測値をスムーズに結んで実線で示し、濃度に対して透過光強度の対数が直線的に変化しているタンパク質濃度 15～100 mg/dl での実測値を結んだ直線を延長させて点線で示した。図 4 で示したように、タンパク質濃度が 2 および 5 mg/dl のような低濃度の場合には、この点線から外れる場合がある。これは、混濁していない全出力信号（= 1.0 V）に比べて変化割合が小さすぎるため、各種ノイズの影響を受けやすいからである。このことから、透過光強度の計測値からタンパク質濃度を算出する場合において、各種ノイズの影響を避けるためには、被検溶液が高濃度域（約 15 mg/dl 以上）にあることがより望ましいことが分かる。

従って、これらから得られた図 3 および図 4 を、それぞれの低濃度域および高濃度域における標準的な検量線として使用することが望ましい。図 3 および図 4 は、被検溶液、試薬、および雰囲気温度が 40℃ の例を示したが、0～50℃ の範囲においても計測可能であった。従って、試薬としてトリクロロ酢酸を使用した時とは異なり、25℃ 以上でも計測でき、家庭でありうる環境温度でも使用可能である。

【0018】

以上のようにして、被検溶液にタンニン水溶液試薬を混入して、透過光強度あるいは散乱光強度を計測することにより、被検溶液のタンパク質濃度を求めることができる。

さらに、上記双方の強度を計測することにより、低濃度域の被検溶液については、散乱光強度の計測値から溶液濃度を算出し、高濃度域の被検溶液については

、透過光強度の計測値から溶液濃度を算出することにより、実質的に高精度に測定できる被検溶液の濃度範囲、即ちダイナミックレンジを拡大できる。これにより、従来必要であった高濃度被検溶液の希釈等の工程が不要になり、計測および検査の高精度化、効率化、および省力化に有効な実用的効果を高めることができる。

なお、本実施の形態では、タンニン水溶液試薬の濃度が 1 g/dl の例を示した。この場合、被検溶液への混入比率が $1:1$ のため、混入後の濃度は 0.5 g/dl となるが、これ以外の混入後濃度でも、 $5 \times 10^{-3} \sim 5 \text{ g/dl}$ の範囲にあれば、各混入後タンニン濃度に応じて検量線を作成することにより、タンパク質濃度を計測できる。上記の範囲よりも、タンニンが低濃度の場合は、タンパク質が凝集しないこともあり、安定的な計測が難しい。また、上記の範囲よりも、タンニンが高濃度の場合は、凝集したタンパク質が急激に沈殿して、混濁が不均一になり、略平行光 2 の付近では濃度に応じて混濁がしないこともあり、安定的な計測が難しい。従って、上記濃度範囲で計測することが実用上望ましい。

【0019】

《実施の形態2》

本実施の形態は、被検溶液にタンニン酸水溶液を混入しタンパク質を凝集させることにより被検溶液を混濁させ、混入前後の混濁度の変化からタンパク質濃度を計測する方式である。具体的には、濃度 $= 3 \times 10^{-4} \text{ M}$ ($\equiv 0.05 \text{ g/dl}$) のタンニン酸水溶液試薬を、被検溶液の容量 9 に対して 1 の比率で混入して、試薬を混入する前後の透過光強度および／または散乱光強度を計測し、それらの計測値から被検溶液中のタンパク質濃度を求める例である。この場合、混入後のタンニン酸の濃度は $3 \times 10^{-5} \text{ M}$ ($\equiv 5 \times 10^{-3} \text{ g/dl}$) である。なお、実施の形態 1 と同様、以下の操作は気温約 40°C の部屋で実施され、被検溶液、試薬および計測装置とも約 40°C の状態にあった。

【0020】

図 5 は、本発明のタンパク質濃度の計測方法に使用する装置の概略構成を示す側面図であり、図 6 はその光学系の平面図である。これらの図において、1～7 は図 1 および図 2 の 1～7 と全く同じ構成要素を示し、それらの配置も同様であ

る。サンプルセル3の底部には、試薬の混入口8が設けてあり、この混入口8を通じて、ピペッタ9により、試薬の所定容量をサンプルセル3中の被検溶液に混入する。コンピューター6は、光源1およびピペッタ9を制御するとともに、光センサー4および5の出力信号を解析する。

【0021】

上記の計測装置を用いて、尿を被検溶液として尿タンパク濃度を検査する場合の動作は次の通りである。

まず、被検溶液1.8mlをサンプルセル3へ導入する。コンピューター6が光源1を動作させ、同時に光センサー4および5の出力信号のモニターを開始する。次に、コンピューター6がピペッタ9を制御して、混入口8を通じてタンニン酸水溶液試薬をサンプルセル3へ0.2ml混入する。被検溶液にタンニン酸試薬が混入されると、タンパク質成分が凝集して被検溶液が濁り、透過光強度が低下し、散乱光強度が増加する。この試薬の混入の前後の光センサー4および5のそれぞれの出力信号の計測値を解析することにより、タンパク質濃度を求める。

【0022】

タンパク質濃度が5mg/dlの被検溶液を用い、上記の方法で測定した散乱光強度および透過光強度、即ち、光センサー5および4の出力信号をそれぞれ図7および図8に示す。図7および8において、横軸は試薬混入後の経過時間（秒）、縦軸はセンサーで検知された光強度をそれぞれ表し、混入前60秒から混入後300秒までの散乱光あるいは透過光の強度変化を示している。

このような、散乱光強度の変化および透過光強度の比とタンパク質濃度との相関関係をそれぞれ図9および図10に示す。図9においては、試薬混入前の散乱光強度と混入後300秒経過時の散乱光強度との差（試薬混入後の散乱光強度－試薬混入前の散乱光強度）を縦軸に示した。図10においては、試薬混入前の透過光強度と混入後300秒経過時の透過光強度との比（試薬混入後の透過光強度／試薬混入前の透過光強度）を縦軸に示した。なお、図9および10には前記タンパク質濃度＝5mg/dlの被検溶液以外に、タンパク質濃度が0、15、30、60、100mg/dlの尿を被検溶液としてそれぞれ追加して計測した結

果を示した。これらの場合、計測した被検溶液はすべて、試薬の混入前には光学的に水と同程度に透明であり、透過光強度と散乱光強度は水と同じであった。

【 0 0 2 3 】

図 9 において、各実測値をスムーズに結んで実線で示し、散乱光強度の変化量（試薬混入前後の散乱光強度の差）に対して直線的に変化しているタンパク質濃度 $0 \sim 30 \text{ mg/dl}$ の領域の実測値を結んだ直線を延長させて点線で示した。この実線を検量線とすることにより、タンパク質濃度を計測することができる。また、この実線と点線から明らかなように、タンパク質濃度が約 30 mg/dl までは実線と点線が重なり、散乱光強度の変化量はタンパク質濃度に比例している。しかし、これより高濃度になるにつれて、次第に比例関係よりも低い実測値を示している。これは、タンパク質濃度が高くなり、光が散乱される確率が高くなると、散乱光が発生した地点からサンプルセルの外まで伝搬する際に、再び散乱される確率も高くなり、光センサー 5 に散乱光が到達する確率が低下するからである。従って、散乱光強度の変化から濃度を算出する場合には、直線性が確保できる低濃度域（約 30 mg/dl 以下）において、より高精度な濃度を求めることができる。

【 0 0 2 4 】

図 10 において、横軸はタンパク質濃度を、縦軸（対数表示）は試薬混入前後の透過光強度の比を示す。各実測値をスムーズに結んで実線で示し、直線的に変化しているタンパク質濃度 $60 \sim 100 \text{ mg/dl}$ での実測値を結んだ直線を延長させて点線で示した。この実線を検量線とすることによりタンパク質濃度を計測することができる。また、図 10 で示したように、タンパク質濃度 30 mg/dl 以下の低濃度領域の場合には、この点線から外れる場合がある。これは、全出力信号に比べて変化割合が小さすぎるため、各種ノイズの影響を受けやすいからである。このことから、透過光強度の計測値からタンパク質濃度を算出する場合において、各種ノイズの影響を避けるためには、被検溶液が高濃度域（約 30 mg/dl 以上）にあることがより望ましいことが分かる。

【 0 0 2 5 】

以上のようにして、試薬混入前後の透過光強度あるいは試薬混入前後の散乱光

強度を計測することにより、被検溶液のタンパク質濃度を求めることができる。さらに、上記双方の強度を計測することにより、低濃度域の被検溶液については、散乱光強度の計測値から溶液濃度を算出し、高濃度域の被検溶液については、透過光強度の計測値から溶液濃度を算出することにより、実質的に高精度に測定できる被検溶液の濃度範囲、即ちダイナミックレンジを拡大できる。

【 0 0 2 6 】

本実施の形態によれば、各種塩などが析出して混濁した尿を被検溶液としてタンパク質濃度を求めることができる。これについて以下に説明する。

まず、被検溶液としてタンパク質濃度 30 mg/dl の混濁した尿をサンプルセル 3 へ導入した。この時の、光センサー 5 の出力信号（散乱光強度）は 0.05 V 程度である。図 7 から、混濁が無い被検溶液の場合は、混入前の光センサー 5 の出力信号は 0.0 V であることから、この出力信号の差が本実施の形態の被検溶液本来の混濁程度を示しているといえる。この値は図 9 の実線を検量線として、タンパク質濃度に換算すると $10 \sim 12 \text{ mg/dl}$ に相当する。ここで、試薬を混入し、光センサー 4 および／または光センサー 5 の出力信号の変化を観測した。試薬を混入後 300 秒経過した時点の光センサー 5 の出力信号は、 0.19 V で、 0 秒時点の出力信号との差は 0.14 V となる。図 9 を検量線として、この出力信号の差（ 0.14 V ）をタンパク質濃度に換算すると 30 mg/dl となり、この濃度があらかじめ計測された既知濃度に一致する。このことから、混濁が無い被検溶液から求めた図 9 の検量線を用いて、試薬混入前後の光センサー 5 の出力信号の差から混濁被検溶液のタンパク質濃度を正確に求められることが確認された。

【 0 0 2 7 】

以上のように、試薬の混入前後の散乱光強度の差より、溶液濃度を算出することにより、混濁等の影響が消去された正確な溶液濃度を求めることが可能になる。一方、試薬の混入前の光センサー 4 の出力信号（透過光強度）は 0.55 V である。混濁が無い透明な被検溶液の場合は、図 8 のように混入前の光センサー 4 の出力信号は 0.6 V であることから、この相違は被検溶液の混濁によるものといえる。試薬混入後 300 秒経過した時点での出力信号が 0.45 V であり、

その比は0.82となる。図10を検量線として、この出力信号の比(0.82)をタンパク質濃度に換算すると30mg/dlとなり、この濃度はあらかじめ計測された既知濃度に一致する。このことから、試薬混入前後の光センサー4の出力信号の比を求め、混濁が無い被検溶液から求めた図10を検量線として、タンパク質濃度に換算することにより、混濁した被検溶液の正確なタンパク質濃度を求められることが確認された。

【0028】

なお、本実施の形態では、試薬混入直前と300秒経過時点の透過光強度および散乱光強度の計測値から溶液濃度を求めたが、この時間差は計測装置、被検溶液やタンニン酸試薬の濃度などの特性に応じて適宜に設定すればよい。

また、図7～10は被検溶液、試薬、および雰囲気温度が40℃の例を示したが、0～50℃の範囲においても計測可能であった。従って、試薬としてトリクロロ酢酸を使用した時とは異なり、25℃以上でも計測でき、家庭でありうる環境温度でも使用可能である。

本実施の形態では、タンニン酸水溶液試薬の濃度が $3 \times 10^{-4} \text{M}$ ($\equiv 0.05 \text{g/dl}$)で、被検溶液の容量0.9に対して0.1の比率で混入することで、混入後のタンニン酸の濃度が $3 \times 10^{-5} \text{M}$ ($\equiv 5 \times 10^{-3} \text{g/dl}$)の例を示した。これ以外の混入後濃度でも、 $3 \times 10^{-5} \sim 3 \times 10^{-2} \text{M}$ ($5 \times 10^{-3} \sim 5 \text{g/dl}$)の範囲にあれば、各混入後タンニン酸濃度に応じて検量線を作成することによりタンパク質濃度を計測できる。上記の範囲よりも、タンニン酸が低濃度の場合は、タンパク質が凝集しないこともあり、安定的な計測が難しい。また、上記の範囲よりも、タンニン酸が高濃度の場合は、凝集したタンパク質が急激に沈殿して、混濁が不均一になり略平行光2付近では濃度に応じて混濁がしないこともあり、安定的な計測が難しい。従って、上記濃度範囲で計測することが実用上望ましい。

【0029】

本実施の形態では、被検溶液と試薬の混入比率が9:1の例を示したが、混入後のタンニン酸の濃度が前記の例と同じく $3 \times 10^{-5} \text{M}$ ($\equiv 5 \times 10^{-3} \text{g/dl}$)であっても、混入比率が異なると、検量線も異なるため、この混入比率に応じ

た検量線を作成する必要がある。この際、被検溶液と試薬の混入比率が大きく、例えば 1 : 1 になると、同じタンパク質濃度の被検溶液に対する混濁は小さくなる。従って、単にタンパク質濃度に対する感度を向上させるには、混入比率を小さくすると有利になるので、混入後のタンニン酸の濃度を一定とした場合、タンニン酸の濃度が高いタンニン酸水溶液試薬を利用する方が有利である。ここで、試薬が使用される家庭でありうる環境温度である 0 ~ 4 0 ℃においても、析出や変質がないタンニン酸濃度は、1. 5 M ($\approx 250 \text{ g/dl}$) 以下であることが判明したので、タンニン酸水溶液試薬の濃度をこの濃度以下に設定することが実用上有利である。

【 0 0 3 0 】

《実施の形態 3》

図 5 および図 6 に示した計測装置を用い、実施の形態 2 と同様の方法により、光センサー 4 および光センサー 5 の双方の出力信号を計測し、両計測値を照合することにより、浮遊粒子、泡等による計測妨害の有無を検知する例を説明する。

被検溶液中に、浮遊粒子や泡が存在し、これらが略平行光 2 の光路に侵入すると、これらに略平行光 2 が強く散乱されて透過光強度および／または散乱光強度の正確な計測が妨害される。この場合、透過光強度は大きく減少する。一方、散乱光強度は、光センサー 5 の視野角、および浮遊粒子や泡が光路中に存在する位置などによって、大きく減少する場合と増加する場合がある。

これら浮遊粒子や泡による妨害が無い場合は、図 9 および図 1 0 で示したように、散乱光強度の計測値と透過光強度の計測値には、一定の関係が存在する。例えば、被検溶液のタンパク質濃度が 30 mg/dl のとき、タンニン酸水溶液試薬混入前後の散乱光強度の差は 0. 1 4 V で、試薬混入前後の透過光強度の比は 0. 8 2 である。ところが、上記のような妨害が存在すると、このような関係から外れた値が計測されることになる。従って、タンニン酸水溶液試薬混入前後の光センサー 4 の計測値から図 1 0 の検量線にもとづいて求めたタンパク質濃度と、光センサー 5 の出力信号の計測値から図 9 の検量線にもとづいて求めたタンパク質濃度との、双方の濃度値が一致するか否かを照合することにより、前記の妨害の有無を検知することができる。

【 0 0 3 1 】

以上のように本実施の形態によれば、タンニン酸水溶液試薬混入前後の透過光強度および試薬混入前後の散乱光強度の双方を測定し、これらを照合することにより、浮遊粒子、泡等による妨害を検知して誤計測を防止できる。これにより、計測の信頼性を向上させることができ、その実用的効果は極めて大きく、計測および検査の高信頼化および省力化が可能になる。

【 0 0 3 2 】

《実施の形態 4》

試薬混入前に被検溶液の旋光度を計測するとともに、被検溶液に m-ガロイル没食子酸水溶液を混入してタンパク質を凝集させることにより、被検溶液を混濁させ、試薬混入前後の混濁度の変化からタンパク質濃度を計測し、これらの計測値から、タンパク質濃度とタンパク質以外の旋光性物質の濃度を確定する方法の例を説明する。

具体的には、まず被検溶液の旋光度を計測した後に、濃度 $= 7.8 \times 10^{-1} \text{ M}$ ($\equiv 250 \text{ g/dl}$) の m-ガロイル没食子酸水溶液試薬を、被検溶液の容量 49 に対して 1 の比率で混入して、試薬を混入する前後の透過光強度を計測する。そして、この計測値から被検溶液中のタンパク質濃度を求め、この濃度と旋光度の計測結果より、タンパク質以外の旋光性物質の濃度を確定する。この場合、試薬混入後の m-ガロイル没食子酸の濃度は $1.6 \times 10^{-1} \text{ M}$ ($\equiv 5 \text{ g/dl}$) である。これについて、以下に詳細に説明する。

【 0 0 3 3 】

図 11 は本実施の形態に使用する計測装置の構成を模式的に示す図である。半導体レーザモジュールの光源 11 から、波長 670 nm、強度 3.0 mW、ビーム直径 2.0 mm の略平行光 12 を投射する。偏光子 17 は、紙面に平行な偏光成分の光のみを透過する。被検溶液を収容するサンプルセル 13 は、被検溶液に略平行光 12 の伝搬方向に磁場を印加できるようにソレノイドコイル 14 を巻いた構造になっており、実質光路長は 50 mm で、定格容量は 5 ml である。これは、被検溶液の光ファラデー効果を用いて、ソレノイドコイル 14 に流す電流を変調しながら制御することによって、略平行光 12 の偏光方向を変調しながら制

御するものである。このように、被検溶液自身のファラデー効果によって、旋光度を計測する方式の基本原理は、特開平9-145605号公報に記載されている。

サンプルセル13は、試薬の混入口15、および空気の出入りする通気口16を有する。検光子18は、紙面に垂直な偏光成分の光のみを透過するように配置されている。検光子18を透過した略平行光12は光センサー19で検出される。信号発生器21は、ソレノイドコイル14に流す電流を変調する変調信号をコイルドライバー20に供給する。コイルドライバー20は、ソレノイドコイル14に流す電流を制御する。ロックインアンプ22は、ソレノイドコイル14の変調信号を参照信号として光センサー19の出力信号を位相敏感検波する。被検溶液の旋光度を計測する際は、コンピューター23により、ロックインアンプ22の出力信号がゼロになるように、コイルドライバー20に制御電流信号を供給する。

【0034】

本実施の形態においては、ソレノイドコイル14に、振幅0.001アンペア、周波数1.3kHzの変調電流を流している。これらによって、ロックインアンプ22の出力信号がゼロになる制御電流信号を見だし、旋光度を算出する。ここでは、被検溶液中の旋光性物質であるタンパク質やグルコースによって生じた旋光度と、磁場印加による被検溶液の溶媒水のファラデー効果による偏光方向の回転角が一致する磁場を与える制御電流信号によって前記旋光度を求める方法を採用した。

ピペッタ24は、チューブ25を通じて、混入口15より、サンプルセル13中の被検溶液にm-ガロイル没食子酸水溶液試薬を0.1ml混入する。コンピューター23は、光源11およびピペッタ24を制御し、光センサー19の出力信号を解析する。

【0035】

上記の装置を用いて、尿を被検溶液としてグルコース濃度（尿糖値）および尿タンパク濃度を検査する場合の動作は次の通りである。

まず、被検溶液をサンプルセル13へ導入する。コンピューター23で光源1

1 とコイルドライバー 2 0 を動作させ、被検溶液の旋光度を計測する。

次に、コンピュータ 2 3 でコイルドライバー 2 0 の動作を停止させ、同時に光センサー 1 9 の出力信号のモニターを開始する。次に、コンピュータ 2 3 でピペッタ 2 4 を制御して、混入口 1 5 より m-ガロイル没食子酸水溶液試薬をサンプルセル 1 3 中の被検溶液へ混入する。この混入の前後の光センサー 1 9 の出力信号の変化を、透過光強度の変化と見なして、解析された試薬混入前後の透過光強度の比から、実施の形態 2 と同様な方法により、タンパク質濃度が、0、2、5、15、60 mg/dl の尿を被検溶液として図 1 0 に相当する検量線を作成した。この検量線を図 1 2 に示す。

【0036】

上記の計測の例として、尿糖値が 100 mg/dl、尿タンパク濃度が 15 mg/dl の尿を被検溶液として用いた場合の旋光度の計測値は、 0.017° であった。この波長 (670 nm) におけるグルコースの比旋光度は $40^{\circ} \text{deg} / \text{cm} \cdot \text{dl} / \text{kg}$ であるので、計測された旋光度がすべてグルコースにより発現されていると仮定すると、グルコース濃度即ち尿糖値は 85 mg/dl と計算される。一方、透過光強度の比は 0.41 であったので、図 1 2 から求めたタンパク質濃度は 15 mg/dl となる。タンパク質の比旋光度が $-40^{\circ} \text{deg} / \text{cm} \cdot \text{dl} / \text{kg}$ であることから、タンパク質により発現された旋光度は -0.003° と算出される。従って、グルコースにより発現された真の旋光度は前記の 0.017° から -0.003° を差し引いた 0.02° となり、この旋光度に対応するグルコース濃度は 100 mg/dl と算出される。

【0037】

これらのことから、本実施の形態により、m-ガロイル没食子酸水溶液試薬混入前の被検溶液の旋光度と試薬混入前後の透過光強度の比を計測することにより、尿糖値と尿タンパク濃度を同時に正確に確定できることが確認された。

以上のように本実施の形態によれば、タンパク質濃度と、タンパク質以外の旋光性物質としてグルコースの濃度を同時に測定することができるので、尿を被検溶液とした場合に、特にその実用性が高い。その理由を以下に述べる。

尿タンパク濃度が正常な場合は、尿中の旋光性物質としては、グルコースが支

配的なので、尿の旋光度を計測することによりおよその尿糖値を検査できる。しかし、尿タンパク濃度を旋光度計測以外の計測方式で求めることにより、より正確な尿検査ができる。なぜなら、グルコースとともに、タンパク質も旋光性物質であるため、グルコースより発現された旋光度と、タンパク質により発現された旋光度を加算した旋光度が尿の旋光度として計測されるからである。そこで、本実施の形態のように、旋光度の計測とともに、上記のように試薬混入前後の光学的物性変化からタンパク質濃度を求め、この濃度により、旋光度の計測結果を補正することにより、尿糖値と尿タンパク濃度を正確に確定することができる。

ちなみに、旋光度の計測前に試薬を混入すると、タンパク質成分が凝集するので、被検溶液中を光が透過しなかったり、タンパク質が変性して旋光度を変化させたりすることがあり、尿糖値と尿タンパク濃度を正確に測定できない。

【 0 0 3 8 】

本実施の形態では、波長 = 6 7 0 n m の光を用いて、旋光度と透過光強度を計測した例を示したが、一般的に物質の比旋光度は、物質固有の吸収（グルコースの場合 1 8 0 n m 付近）が始まる波長までは、波長が短いほど大きくなる。更に、タンパク質の凝集による濁度は、短い波長に対するほど大きくなる。従って、短い波長の光を用いて、旋光度、透過光強度、および散乱光強度を計測した方が、感度的には有利になる。ただし、被検溶液が尿の場合、尿中に含まれるウロクローム等の色素により、波長が 5 0 0 n m 以下の光は吸収される。このため、波長が 5 0 0 n m より短い光で計測すると、かえって精度が悪化することがある。従って、波長が 5 0 0 n m 以上の光を用いて計測するのが実用的である。

本実施の形態では、被検溶液と試薬の混入比率が 4 9 : 1 の例を示したが、混入後の m - ガロイル没食子酸の濃度が例と同じく $1.6 \times 10^{-1} \text{ M}$ ($\equiv 5 \text{ g / d l}$) であっても、混入比率が異なると、検量線も異なるため、この混入比率に応じた検量線を作成する必要がある。この際、被検溶液と試薬の混入比率が大きく、例えば 1 : 1 になると、同じタンパク質濃度の被検溶液に対する混濁は小さくなる。従って、単にタンパク質濃度に対する感度を向上させるには、混入比率を小さくすると有利になるので、混入後の m - ガロイル没食子酸の濃度を一定とした場合、本実施の形態のように m - ガロイル没食子酸の濃度が高い試薬を利用す

る方が有利である。ここで、試薬が使用される家庭でありうる環境温度である 0 ~ 4 0 °C においても、析出や変質がない m-ガロイル没食子酸濃度は、7. 8 M ($\equiv 250 \text{ g/dl}$) 以下であることが判明したので、m-ガロイル没食子酸水溶液試薬の濃度をこの濃度以下に設定した。

【0039】

《実施の形態 5》

本実施の形態においてはタンニン濃度 = 1 g/dl 、クエン酸濃度 = 20 g/dl のタンニークエン酸水溶液を試薬として用いた例を示す。本試薬の pH は約 1. 4 ~ 1. 5 であった。

本試薬を被検溶液に容量比 1 : 1 の比率で混入してタンパク質を凝集させることにより被検溶液を混濁させ、その散乱光強度を計測し、この計測値から被検溶液中のタンパク質濃度を求める例について説明する。

図 1 に示す計測装置を用いて、タンパク質水溶液を被検溶液としてタンパク質濃度を計測する手順を以下に説明する。なお、以下の操作は気温約 4 0 °C の部屋で実施され、被検溶液、試薬および計測装置とも約 4 0 °C の状態にあった。

まず、被検溶液 1 ml をビーカー等に入れ、タンニン濃度 = 1 g/dl 、クエン酸濃度 = 20 g/dl のタンニークエン酸水溶液 1 ml をこのビーカーに入れ、攪拌する。次に、この混合溶液をサンプルセル 3 へ導入する。コンピューター 6 が光源 1 を動作させ、同時に光センサー 4 および 5 の出力信号を計測する。

被検溶液にタンニン水溶液試薬が混入されると、タンパク質成分が凝集して被検溶液が濁り、透過光強度が低下し、散乱光強度が増加する。この時の光センサー 4 および 5 のそれぞれの出力信号の計測値を解析することにより、タンパク質濃度を求める。

【0040】

あらかじめ濃度が 0、2、5、15、30、60、100、250、500 mg/dl のタンパク質（血清アルブミン）水溶液を作成した。これら被検溶液を用い、上記の方法で散乱光強度および透過光強度、即ち、光センサー 5 および 4 の出力信号を計測した。それらの結果をそれぞれ図 13 および図 14 に示す。図 13 においては、タンパク質濃度を横軸に、散乱光強度を縦軸（光センサー 5 の

出力信号)に示した。図14においては、タンパク質濃度を横軸に、透過光強度を縦軸(光センサー4の出力信号)に示した。なお、これらすべての被検溶液は、上記試薬と混入される前は、水と同程度に透明であり、透過光強度と散乱光強度は水と同じであった。また、濃度=0、即ち水の場合、上記試薬を混入した場合と混入しない場合との、透過光強度と散乱光強度の差は観測できず、実質的に透明であった。

【0041】

図13において、各実測値をスムーズに結んで実線で示し、散乱光強度が濃度に対して直線的に変化しているタンパク質濃度0~15mg/dlの領域の実測値を結んだ直線を延長させて点線で示した。この実線と点線から明らかなように、タンパク質濃度が約15mg/dlまでは実線と点線が重なり、散乱光強度はタンパク質濃度に比例している。しかし、これより高濃度になるにつれて、次第に比例関係よりも低い実測値を示している。これは、タンパク質濃度が高くなり、光が散乱される確率が高くなると、散乱光が発生した地点からサンプルセルの外まで伝搬する際に、再び散乱される確率も高くなり、光センサー5に散乱光が到達する確率が低下するからである。従って、散乱光強度の変化から濃度を算出する場合には、直線性が確保できる低濃度域(約15mg/dl以下)において、特に高精度に濃度を算出することができる。この直線性から外れる約15mg/dlより高い、中から高濃度域においては、実線で示した検量線を求めて、これに当てはめることによって濃度を求めることができる。

【0042】

また、濃度が500mg/dlまでの領域においては、被検溶液が完全に飽和することがないため、一意的に濃度を求めることができることを確認できた。

ここで、タンニン水溶液にクエン酸を混入しなかった場合は、濃度が500mg/dlのときの散乱光強度(光センサー5の出力信号)が1.0V以下になることがあり、濃度を約120mg/dl以下と見積もってしまう誤動作が発生してしまうことがあった。

しかし、本実施の形態のように、クエン酸をタンニン水溶液に混入して試薬としたことで、500mg/dlのような高濃度においても、濃度に応じた濁度を

発生させることができた。

【0043】

図14において、横軸はタンパク質濃度を、縦軸（対数表示）は透過光強度を示す。各実測値をスムーズに結んで実線で示し、濃度に対して透過光強度の対数が直線的に変化している中濃度域のタンパク質濃度15～100mg/dlでの実測値を結んだ直線を延長させて点線で示した。図4で示したように、タンパク質濃度が2および5mg/dlのような低濃度の場合には、この点線から外れる場合がある。これは、混濁していない全出力信号（＝1.0V）に比べて変化割合が小さすぎるため、各種ノイズの影響を受けやすいからである。このことから、透過光強度の計測値からタンパク質濃度を算出する場合において、各種ノイズの影響を避けるためには、被検溶液が中濃度域（約15～100mg/dl）にあることがより望ましいことが分かる。

【0044】

しかし、これより高濃度域（約100mg/dl以上）になるにつれて、次第にこの直線状の点線から実線が離れて行く。これは、濁度が非常に大きくなると、多重散乱等により、複数の経路を伝搬した光が光センサ4に到達したり、光センサ4の出力信号が小さくなると（ 10^{-4} V程度）、各種電気ノイズの影響を受けやすくなり等の現象が複合して発生する。従って、透過光強度から濃度を算出する場合には、直線性が確保できる中濃度域（約15～100mg/dl）において、特に高精度に濃度を算出することができる。この直線性から外れる100mg/dlより高い、中から高濃度域においては、実線で示した検量線を求めて、これに当てはめることによって濃度を求めることができる。また、濃度が500mg/dlまでの領域においては、完全に飽和することがないため、一意的に濃度を求めることができることを確認できた。

【0045】

ここで、タンニン水溶液にクエン酸を混入しなかった場合は、濃度が500mg/dlの透過光強度（光センサ4の出力信号）が0.05V以上になることがあり、濃度を約120mg/dl以下と見積もってしまう誤動作が発生してしまうことがあった。しかし、本実施の形態のように、クエン酸をタンニン水溶液に

混入して試薬としたことで、500mg/dlのような高濃度においても、濃度に応じた濁度を発生させることができた。従って、これらから得られた図3および図4の点線を、それぞれ低濃度域および中濃度域の濃度の算出に使用すると、高い精度を確保することができる。

【0046】

図13および図14は、被検溶液、試薬、および雰囲気温度が40℃の例を示したが、0～50℃の範囲においても計測可能であった。ただし、この場合においては、各温度における図13、14の点線および実線に相当する新たな点線および実線を求めておき、これに対応させることが望ましい。従って、試薬としてトリクロロ酢酸を使用した時とは異なり、25℃以上でも計測でき、家庭でありうる環境温度でも使用可能である。

以上のようにして、被検溶液にタンニン水溶液試薬を混入して、透過光強度あるいは散乱光強度を計測することにより、被検溶液のタンパク質濃度を求めることができる。

さらに、上記双方の強度を計測することにより、低濃度域の被検溶液については、散乱光強度の計測値から溶液濃度を算出し、中濃度域の被検溶液については、透過光強度の計測値から溶液濃度を算出することにより、実質的に高精度に測定できる被検溶液の濃度範囲、即ちダイナミックレンジを拡大できる。これにより、従来必要であった高濃度被検溶液の希釈等の工程が不要になり、計測および検査の高精度化、効率化、および省力化に有効な実用的効果を高めることができる。

【0047】

被検溶液である濃度が0、2、5、15、30、60、100、250、500mg/dlのタンパク質（血清アルブミン）水溶液と試薬である上記タンニークエン酸水溶液を混入して得られる混合水溶液のpHは1.5～1.9であった。なお、本実施の形態では、タンニン水溶液へ、酸としてクエン酸を添加して試薬とする例を示したが、被検溶液と試薬を混入した後の溶液のpHが1.5～5.8になる酸であれば同様の効果が得られる。また、被検溶液に酸を混入しても、試薬混入後の溶液のpHが1.5～5.8になるようにすれば同様の効果が

得られる。ただし、酸の種類や、被検溶液または／および試薬に混入する酸の量が異なれば、異なった検量線（図13、14の点線および実線に相当）が得られるため、そのつど新たな検量線（図13、14の点線および実線に相当）を作成する必要がある。上記のpH範囲以外では、全くタンパク質が凝集しないことも有り、安定した計測を実現することができないことないことが有り、上記pH範囲で計測することが実用上望ましい。

【0048】

なお、本実施の形態では、タンニン水溶液試薬の濃度が1g/dlの例を示した。この場合、被検溶液への混入比率が1:1のため、混入後の濃度は0.5g/dlとなるが、これ以外の混入後濃度でも、 $5 \times 10^{-3} \sim 5$ g/dlの範囲にあれば、各混入後タンニン濃度に応じて検量線（図13、14の点線および実線に相当）を作成することにより、タンパク質濃度を計測できる。上記の範囲よりも、タンニンが低濃度の場合は、タンパク質が凝集しないこともあり、安定的な計測が難しい。また、上記の範囲よりも、タンニンが高濃度の場合は、凝集したタンパク質が急激に沈殿して、混濁が不均一になり、略平行光2の付近では濃度に応じて混濁がしないこともあり、安定的な計測が難しい。従って、上記濃度範囲で計測することが実用上望ましい。

【0049】

さらに、本実施の形態では、約15mg/dl以下の低濃度域、約15～100mg/dlの中濃度域、約100mg/dl以上の高濃度域について、低濃度域では散乱光強度で、中濃度域では透過光強度に基づいて計測するとより高精度の結果が得られることを述べた。しかし、上記で述べた各低中高の濃度域の濃度範囲は、サンプルセル3の光路長や、散乱光7の被検溶液中における伝搬距離、光学系の配置、試薬の種類などによって異なるため、上記した数値に限定されるものではない。実際、透過光の光路長を本実施の形態の例よりも長く（10mmよりも長く）すれば、透過光強度を計測することでも、濃度が15mg/dl以下でも高精度に算出することができる。しかし、このように光路長を拡大すると、高濃度域においては、光センサ4の出力信号が小さくなりすぎ（約 10^{-4} V程度）、濃度を求めることが困難になる。更に、光路長を拡大することは、必然的

に装置規模も拡大することになり、実用上好ましいことではない。本発明において得られる最大のメリットは、装置構成や規模が一定の制約下にあることにおいて、散乱光、透過光双方を利用することで、計測濃度範囲、即ちダイナミックレンジが拡大できることである。

【 0 0 5 0 】

《実施の形態 6》

本実施の形態は、被検溶液にタンニン酸およびクエン酸水溶液を混入しタンパク質を凝集させることにより被検溶液を混濁させ、混入前後の混濁度の変化からタンパク質濃度を計測する方式である。具体的には、タンニン酸濃度 $= 3 \times 10^{-4} \text{M}$ ($\equiv 0.05 \text{ g/dl}$)、クエン酸濃度 $= 5 \text{ g/dl}$ のタンニン酸-クエン酸水溶液を試薬として用いた例である。本試薬の pH は約 1.8 ~ 2.0 であった。

タンニン酸-クエン酸水溶液試薬を、被検溶液の容量 9 に対して 1 の比率で混入して、試薬を混入する前後の透過光強度および／または散乱光強度を計測し、それらの計測値から被検溶液中のタンパク質濃度を求める例である。この場合、混入後のタンニン酸の濃度は $3 \times 10^{-5} \text{M}$ ($\equiv 5 \times 10^{-3} \text{ g/dl}$) である。なお、実施の形態 5 と同様、以下の操作は気温約 40℃ の部屋で実施され、被検溶液、試薬および計測装置とも約 40℃ の状態にあった。

【 0 0 5 1 】

図 5 に示す計測装置を用いて、尿を被検溶液として尿タンパク濃度を検査する場合の動作は次の通りである。

まず、被検溶液 1.8 ml をサンプルセル 3 へ導入する。コンピューター 6 が光源 1 を動作させ、同時に光センサー 4 および 5 の出力信号のモニターを開始する。次に、コンピューター 6 がピペッタ 9 を制御して、混入口 8 を通じてタンニン酸-クエン酸水溶液試薬をサンプルセル 3 へ 0.2 ml 混入する。被検溶液にタンニン酸-クエン酸試薬が混入されると、タンパク質成分が凝集して被検溶液が濁り、透過光強度が低下し、散乱光強度が増加する。この試薬の混入の前後の光センサー 4 および 5 のそれぞれの出力信号の計測値を解析することにより、タンパク質濃度を求める。

【 0 0 5 2 】

タンパク質濃度が 5 mg/dl の被検溶液を用い、上記の方法で測定した散乱光強度および透過光強度、即ち、光センサー 5 および 4 の出力信号をそれぞれ図 1 5 および図 1 6 に示す。図 1 5 および 1 6 において、横軸は試薬混入後の経過時間（秒）、縦軸はセンサーで検知された光強度をそれぞれ表し、混入前 6 0 秒から混入後 3 0 0 秒までの散乱光あるいは透過光の強度変化を示している。

このような、散乱光強度の変化および透過光強度の比とタンパク質濃度との相関関係をそれぞれ図 1 7 および図 1 8 に示す。図 1 7 においては、試薬混入前の散乱光強度と混入後 3 0 0 秒経過時の散乱光強度との差（試薬混入後の散乱光強度－試薬混入前の散乱光強度）を縦軸に示した。図 1 8 においては、試薬混入前の透過光強度と混入後 3 0 0 秒経過時の透過光強度との比（試薬混入後の透過光強度／試薬混入前の透過光強度）を縦軸に示した。なお、図 1 7 および 1 8 には前記タンパク質濃度＝ 5 mg/dl の被検溶液以外に、タンパク質濃度が 0、1、5、30、60、100、250、500 mg/dl の尿を被検溶液としてそれぞれ追加して計測した結果を示した。これらの場合、計測した被検溶液はすべて、試薬の混入前には光学的に水と同程度に透明であり、透過光強度と散乱光強度は水と同じであった。

【 0 0 5 3 】

図 1 7 において、各実測値をスムーズに結んで実線で示し、散乱光強度の変化量（試薬混入前後の散乱光強度の差）に対して直線的に変化しているタンパク質濃度 0～30 mg/dl の領域の実測値を結んだ直線を延長させて点線で示した。この実線を検量線とすることにより、タンパク質濃度を計測することができる。

また、この実線と点線から明らかなように、タンパク質濃度が約 30 mg/dl までは実線と点線が重なり、散乱光強度の変化量はタンパク質濃度に比例している。しかし、これより高濃度になるにつれて、次第に比例関係よりも低い実測値を示している。これは、タンパク質濃度が高くなり、光が散乱される確率が高くなると、散乱光が発生した地点からサンプルセルの外まで伝搬する際に、再び散乱される確率も高くなり、光センサー 5 に散乱光が到達する確率が低下するか

らである。従って、散乱光強度の変化から濃度を算出する場合には、直線性が確保できる低濃度域（約 30 mg/dl 以下）において、より高精度な濃度を算出することができる。

【0054】

この直線性から外れる約 30 mg/dl より高い濃度域においては、実線で示した検量線を求めて、これに当てはめることによって濃度を求めることができる。また、濃度が 500 mg/dl までの領域においては、完全に飽和することがないため、一意的に濃度を求めることができることを確認できた。

ここで、タンニン酸水溶液にクエン酸を混入しなかった場合は、濃度が 500 mg/dl の散乱光強度（光センサ 5 の出力信号）が 0 V 程度になることがあり、濃度を約 0 mg/dl としてしまう誤動作が発生することがあった。しかし、本実施の形態のように、クエン酸をタンニン水溶液に混入して試薬としたことで、500 mg/dl のような高濃度においても、濃度に応じた濁度を発生させることができた。

【0055】

図 18 において、横軸はタンパク質濃度を、縦軸（対数表示）は試薬混入前後の透過光強度の比を示す。各実測値をスムーズに結んで実線で示し、直線的に変化しているタンパク質濃度 30～100 mg/dl での実測値を結んだ直線を延長させて点線で示した。この実線を検量線とすることによりタンパク質濃度を計測することができる。また、図 18 で示したように、タンパク質濃度 30 mg/dl 以下の低濃度領域の場合には、この点線から外れる場合がある。これは、全出力信号に比べて変化割合が小さすぎるため、各種ノイズの影響を受けやすいからである。このことから、透過光強度の計測値からタンパク質濃度を算出する場合において、各種ノイズの影響を避けるためには、被検溶液が高濃度域（約 30 mg/dl 以上）にあることがより望ましいことが分かる。また、濃度が 500 mg/dl までの領域においては、飽和現象が観測されなかったため、一意的に濃度を求めることができることを確認できた。

【0056】

ここで、タンニン水溶液にクエン酸を混入しなかった場合は、濃度が 500 m

g/dl の透過光強度（光センサ 4 の出力信号）が 0.6 V 程度になることがあり、濃度を約 0 mg/dl 以下と見積もってしまう誤動作が発生してしまうことがあった。しかし、本実施の形態のように、クエン酸をタンニン水溶液に混入して試薬としたことで、500 mg/dl のような高濃度においても、濃度に応じた濁度を発生させることができた。

従って、これらから得られた図 17 および図 18 の点線を、それぞれ低濃度域および高濃度域の濃度の算出に使用すると、高い精度を確保することができる。

以上のようにして、試薬混入前後の透過光強度あるいは試薬混入前後の散乱光強度を計測することにより、被検溶液のタンパク質濃度を求めることができる。さらに、上記双方の強度を計測することにより、低濃度域の被検溶液については、散乱光強度の計測値から溶液濃度を算出し、高濃度域の被検溶液については、透過光強度の計測値から溶液濃度を算出することにより、実質的に高精度に測定できる被検溶液の濃度範囲、即ちダイナミックレンジを拡大できる。

【0057】

本実施の形態によれば、各種塩などが析出して混濁した尿を被検溶液としてタンパク質濃度を求めることができる。これについて以下に説明する。

まず、被検溶液としてタンパク質濃度 30 mg/dl の混濁した尿をサンプルセル 3 へ導入した。この時の、光センサー 5 の出力信号（散乱光強度）は 0.05 V 程度である。図 15 から、混濁が無い被検溶液の場合は、混入前の光センサー 5 の出力信号は 0.0 V であることから、この出力信号の差が本実施の形態の被検溶液本来の混濁程度を示しているといえる。この値は図 17 の実線を検量線として、タンパク質濃度に換算すると 10～12 mg/dl に相当する。ここで、試薬を混入し、光センサー 4 および／または光センサー 5 の出力信号の変化を観測した。試薬を混入後 300 秒経過した時点の光センサー 5 の出力信号は、0.19 V で、0 秒時点の出力信号との差は 0.14 V となる。図 17 を検量線として、この出力信号の差（0.14 V）をタンパク質濃度に換算すると 30 mg/dl となり、この濃度があらかじめ計測された既知濃度に一致する。このことから、混濁が無い被検溶液から求めた図 17 の検量線を用いて、試薬混入前後の光センサー 5 の出力信号の差から混濁被検溶液のタンパク質濃度を正確に求めら

れることが確認できた。

【 0 0 5 8 】

以上のように、試薬の混入前後の散乱光強度の差より、溶液濃度を算出することにより、混濁等の影響が消去された正確な溶液濃度を求めることが可能になる。

一方、試薬の混入前の光センサー 4 の出力信号（透過光強度）は 0.55 V である。混濁が無い透明な被検溶液の場合は、図 16 のように混入前の光センサー 4 の出力信号は 0.6 V であることから、この相違は被検溶液の混濁によるものといえる。試薬混入後 300 秒経過した時点での出力信号が 0.45 V であり、その比は 0.82 となる。図 18 を検量線として、この出力信号の比（0.82）をタンパク質濃度に換算すると 30 mg / dl となり、この濃度はあらかじめ計測された既知濃度に一致する。このことから、試薬混入前後の光センサー 4 の出力信号の比を求め、混濁が無い被検溶液から求めた図 18 を検量線として、タンパク質濃度に換算することにより、混濁した被検溶液の正確なタンパク質濃度を求められることが確認できた。

【 0 0 5 9 】

なお、本実施の形態では、試薬混入直前と 300 秒経過時点の透過光強度および散乱光強度の計測値から溶液濃度を求めたが、この時間差は計測装置、被検溶液やタンニン酸試薬の濃度などの特性に応じて適宜に設定すればよい。

また、図 15 ～ 18 は被検溶液、試薬、および雰囲気温度が 40℃ の例を示したが、0 ～ 50℃ の範囲においても計測可能であった。従って、試薬としてトリクロロ酢酸を使用した時とは異なり、25℃ 以上でも計測でき、家庭でありうる環境温度でも使用可能である。

本実施の形態で被検溶液として使用した各尿と上記タンニン酸－クエン酸水溶液試薬とを混入した後の、水溶液の pH は、2.4 ～ 3.0 であった。なお、本実施の形態では、タンニン酸水溶液へ、酸としてクエン酸を添加して試薬とする例を示したが、被検溶液と試薬を混入した後の溶液の pH が 1.5 ～ 5.8 になるような酸であれば同様の効果が得られる。また、被検溶液に酸を混入しても、試薬混入後の溶液の pH が 1.5 ～ 5.8 になるようにすれば同様の効果が得ら

れる。ただし、酸の種類や、被検溶液または／および試薬に混入する酸の量が異なれば、異なった検量線（図 1 7、1 8 の点線および実線に相当）が得られるため、そのつど新たな検量線（図 1 7、1 8 の点線および実線に相当）を作成する必要がある。上記の pH 範囲以外では、全くタンパク質が凝集しないことも有り、安定した計測を実現することができないことないことが有り、上記 pH 範囲で計測することが実用上望ましい。

【 0 0 6 0 】

ここで、特に被検溶液が尿の場合、この試薬または／および被検溶液に混入する酸として、フタル酸水素カリウム、酢酸、クエン酸、アスコルビン酸からなる群より選ぶと、適度な緩衝能が得やすく、低コストでかつ扱いやすく、更にリン酸塩、炭酸塩等の析出を誘発する可能性が低く、特に実用的である。

本実施の形態では、タンニン酸濃度 $= 3 \times 10^{-4} \text{M}$ ($\equiv 0.05 \text{ g/dl}$)、クエン酸濃度 $= 5 \text{ g/dl}$ のタンニン-クエン酸水溶液を試薬として用い、被検溶液の容量 0.9 に対して 0.1 の比率で混入することで、混入後のタンニン酸の濃度が $3 \times 10^{-5} \text{M}$ ($\equiv 5 \times 10^{-3} \text{ g/dl}$)、クエン酸濃度 $= 0.5 \text{ g/dl}$ の例を示した。これ以外の混入後濃度でも、タンニン酸濃度 $= 3 \times 10^{-5} \sim 3 \times 10^{-2} \text{M}$ ($5 \times 10^{-3} \sim 5 \text{ g/dl}$) で、 $\text{pH} = 1.5 \sim 5.8$ の範囲にあれば、各混入後タンニン酸およびクエン酸濃度に応じて検量線を作成することによりタンパク質濃度を計測できる。上記の範囲よりも、タンニン酸が低濃度の場合は、タンパク質が凝集しないこともあり、安定的な計測が難しい。また、上記の範囲よりも、タンニン酸が高濃度の場合は、凝集したタンパク質が急激に沈殿して、混濁が不均一になり略平行光 2 付近では濃度に応じて混濁がしないこともあり、安定的な計測が難しい。従って、上記濃度範囲で計測することが実用上望ましい。

【 0 0 6 1 】

本実施の形態では、被検溶液と試薬の混入比率が 9 : 1 の例を示したが、混入後のタンニン酸濃度およびクエン酸濃度が前記の例と同じであっても、混入比率が異なると、検量線も異なるため、この混入比率に応じた検量線を作成する必要がある。この際、被検溶液と試薬の混入比率が大きく、例えば 1 : 1 になると、

同じタンパク質濃度の被検溶液に対する混濁は小さくなる。従って、単にタンパク質濃度に対する感度を向上させるには、混入比率を小さくすると有利になるので、混入後のタンニン酸の濃度を一定とした場合、タンニン酸の濃度が高いタンニン酸水溶液試薬を利用する方が有利である。ここで、試薬が使用される家庭でありうる環境温度である $0 \sim 40^{\circ}\text{C}$ においても、析出や変質がないタンニン酸濃度は、 1.5 M ($\equiv 250\text{ g/dl}$) 以下であることが判明したので、タンニン酸水溶液試薬の濃度をこの濃度以下に設定することが実用上有利である。

同様に、クエン酸の濃度も高い方が有利になるが、上記の環境温度である $0 \sim 40^{\circ}\text{C}$ において析出や変質がない濃度以下であることが必要である。この際、同時にタンニン酸とクエン酸の相互作用による析出や変質がない濃度範囲であることが必要である。

【0062】

《実施の形態7》

図5および図6に示した計測装置を用い、実施の形態2と同様の方法により、光センサー4および光センサー5の双方の出力信号を計測し、両計測値を照合することにより、浮遊粒子、泡等による計測妨害の有無を検知する例を説明する。被検溶液中に、浮遊粒子や泡が存在し、これらが略平行光2の光路に侵入すると、これらに略平行光2が強く散乱されて透過光強度および／または散乱光強度の正確な計測が妨害される。この場合、透過光強度は大きく減少する。一方、散乱光強度は、光センサー5の視野角、および浮遊粒子や泡が光路中に存在する位置などによって、大きく減少する場合と増加する場合がある。

これら浮遊粒子や泡による妨害が無い場合は、図17および図18で示したように、散乱光強度の計測値と透過光強度の計測値には、一定の関係が存在する。例えば、被検溶液のタンパク質濃度が 30 mg/dl のとき、タンニン酸-クエン酸水溶液試薬混入前後の散乱光強度の差は 0.14 V で、試薬混入前後の透過光強度の比は 0.82 である。ところが、上記のような妨害が存在すると、このような関係から外れた値が計測されることになる。従って、タンニン酸-クエン酸水溶液試薬混入前後の光センサー4の計測値から図18の検量線にもとづいて求めたタンパク質濃度と、光センサー5の出力信号の計測値から図17の検量線

にもとづいて求めたタンパク質濃度との、双方の濃度値が一致するか否かを照合することにより、前記の妨害の有無を検知することができる。

【 0 0 6 3 】

以上のように本実施の形態によれば、タンニン-クエン酸水溶液試薬混入前後の透過光強度および試薬混入前後の散乱光強度の双方を測定し、これらを照合することにより、浮遊粒子、泡等による妨害を検知して誤計測を防止できる。これにより、計測の信頼性を向上させることができ、その実用的効果は極めて大きく、計測および検査の高信頼化および省力化が可能になる。

【 0 0 6 4 】

《実施の形態 8》

試薬混入前に被検溶液の旋光度を計測するとともに、被検溶液に m-ガロイル没食子酸-クエン酸水溶液を混入してタンパク質を凝集させることにより、被検溶液を混濁させ、試薬混入前後の混濁度の変化からタンパク質濃度を計測し、これらの計測値から、タンパク質濃度とタンパク質以外の旋光性物質の濃度を確定する方法の例を説明する。

具体的には、まず被検溶液の旋光度を計測した後に、m-ガロイル没食子酸濃度 = 0.047M ($\equiv 1.5 \text{ g/dl}$)、クエン酸濃度 = 0.3 g/dl の m-ガロイル没食子酸水溶液試薬を、被検溶液の容量 49 に対して 1 の比率で混入して、試薬を混入する前後の透過光強度を計測する。本試薬の pH は約 2.6 ~ 2.8 であった。

そして、この計測値から被検溶液中のタンパク質濃度を求め、この濃度と旋光度の計測結果より、タンパク質以外の旋光性物質の濃度を確定する。この場合、試薬混入後の m-ガロイル没食子酸の濃度は $9.4 \times 10^{-4} \text{ M}$ ($\equiv 0.03 \text{ g/dl}$)、クエン酸濃度は 0.006 g/dl である。これについて、以下に詳細に説明する。

【 0 0 6 5 】

実施の形態 4 において用いた図 11 に示す装置を実施の形態 4 と同様の条件で用いて、尿を被検溶液としてグルコース濃度（尿糖値）および尿タンパク濃度を検査する場合の動作は次の通りである。

まず、被検溶液をサンプルセル 1 3 へ導入する。コンピューター 2 3 で光源 1 1 とコイルドライバ 2 0 を動作させ、被検溶液の旋光度を計測する。

次に、コンピューター 2 3 でコイルドライバ 2 0 の動作を停止させ、同時に光センサー 1 9 の出力信号のモニターを開始する。次に、コンピューター 2 3 でピペッタ 2 4 を制御して、混入口 1 5 より m-ガロイル没食子酸-クエン酸水溶液試薬をサンプルセル 1 3 中の被検溶液へ混入する。この混入の前後の光センサー 1 9 の出力信号の変化を、透過光強度の変化と見なして、解析された試薬混入前後の透過光強度の比から、実施の形態 6 と同様な方法により、タンパク質濃度が、0、2、5、15、60、100、250 mg/dl の尿を被検溶液として図 1 8 に相当する検量線を作成した。この検量線を図 1 9 に示す。

【0066】

図 1 9 において、横軸はタンパク質濃度を、縦軸（対数表示）は試薬混入前後の透過光強度の比を示す。各実測値をスムーズに結んで実線で示し、直線的に変化しているタンパク質濃度 0～30 mg/dl での実測値を結んだ直線を延長させて点線で示した。この実線を検量線とすることによりタンパク質濃度を計測することができる。また、図 1 9 で示したように、高濃度域（約 100 mg/dl 以上）になるにつれて、次第にこの直線状の点線から実線が離れて行く。これは、濁度が非常に大きくなると、各種散乱現象の結果、略平行光 1 2 の偏光度が低下して検光子 1 8 を透過する光量が増加したり、多重散乱等により、複数の経路を伝搬した光が光センサ 1 9 に到達したり、光センサ 1 9 の出力信号が小さくなると（10～4 V 程度）、各種電気ノイズの影響を受けやすくなる等の現象が複合して発生する。従って、透過光強度から濃度を算出する場合には、直線性が確保できる 0～60 mg/dl において、特に高精度に濃度を算出することができる。この直線性から外れる 100 mg/dl より高い濃度域においては、実線で示した検量線を求めて、これに当てはめることによって濃度を求めることができる。また、濃度が 250 mg/dl までの領域においては、完全に飽和することがないため、一意的に濃度を求めることができることを確認できた。

【0067】

ここで、m-ガロイル没食子酸水溶液にクエン酸を混入しなかった場合は、濃

度が 250 mg/dl の透過光強度の比 (図 19 の縦軸) が 0.1 程度なることがあり、濃度を約 40 mg/dl と見積もってしまう誤動作が発生してしまうことがあった。しかし、本実施の形態のように、クエン酸をタンニン水溶液に混入して試薬としたことで、 250 mg/dl のような高濃度においても、濃度に応じた濁度を発生させることができた。

上記の計測の例として、尿糖値が 100 mg/dl 、尿タンパク濃度が 15 mg/dl の尿を被検溶液として用いた場合の旋光度の計測値は、 0.017° であった。この波長 (670 nm) におけるグルコースの比旋光度は $40^\circ \text{ deg/cm} \cdot \text{dl/kg}$ であるので、計測された旋光度がすべてグルコースにより発現されていると仮定すると、グルコース濃度即ち尿糖値は 85 mg/dl と計算される。一方、透過光強度の比は 0.41 であったので、図 19 から求めたタンパク質濃度は 15 mg/dl となる。タンパク質の比旋光度が $-40^\circ \text{ deg/cm} \cdot \text{dl/kg}$ であることから、タンパク質により発現された旋光度は -0.003° と算出される。従って、グルコースにより発現された真の旋光度は前記の 0.017° から -0.003° を差し引いた 0.02° となり、この旋光度に対応するグルコース濃度は 100 mg/dl と算出される。

【0068】

上記とは別の計測例として、尿糖値が 50 mg/dl 、尿タンパク濃度が 80 mg/dl の尿を被検溶液として用いた場合の旋光度の計測値は、 -0.006° であった。この波長 (670 nm) におけるグルコースの比旋光度は $40^\circ \text{ deg/cm} \cdot \text{dl/kg}$ であるので、計測された旋光度がすべてグルコースにより発現されていると仮定すると、グルコース濃度が 0 以下になり矛盾する。一方、透過光強度の比は 8×10^{-3} であったので、図 19 から求めたタンパク質濃度は 80 mg/dl となる。タンパク質の比旋光度が $-40^\circ \text{ deg/cm} \cdot \text{dl/kg}$ であることから、タンパク質により発現された旋光度は -0.016° と算出される。従って、グルコースにより発現された真の旋光度は前記の -0.006° から -0.016° を差し引いた 0.01° となり、この旋光度に対応するグルコース濃度は 50 mg/dl と算出される。

【0069】

これらのことから、本実施の形態により、 m -ガライル没食子酸-クエン酸水溶液試薬混入前の被検溶液の旋光度と試薬混入前後の透過光強度の比を計測することにより、尿糖値と尿タンパク濃度を同時に正確に確定できることが確認された。

以上のように本実施の形態によれば、タンパク質濃度と、タンパク質以外の旋光性物質としてグルコースの濃度を同時に測定することができるので、尿を被検溶液とした場合に、特にその実用性が高い。その理由を以下に述べる。

尿タンパク濃度が正常な場合は、尿中の旋光性物質としては、グルコースが支配的なので、尿の旋光度を計測することによりおよその尿糖値を検査できる。しかし、尿タンパク濃度を旋光度計測以外の計測方式で求めることにより、より正確な尿検査ができる。なぜなら、グルコースとともに、タンパク質も旋光性物質であるため、グルコースより発現された旋光度と、タンパク質により発現された旋光度を加算した旋光度が尿の旋光度として計測されるからである。

そこで、本実施の形態のように、旋光度の計測とともに、上記のように試薬混入前後の光学的物性変化からタンパク質濃度を求め、この濃度により、旋光度の計測結果を補正することにより、尿糖値と尿タンパク濃度を正確に確定することができる。

【0070】

ちなみに、旋光度の計測前に試薬を混入すると、タンパク質成分が凝集するので、被検溶液中を光が透過しなかったり、タンパク質が変性して旋光度を変化させたりすることがあり、尿糖値と尿タンパク濃度を正確に測定できない。

本実施の形態では、波長 = 670 nm の光を用いて、旋光度と透過光強度を計測した例を示したが、一般的に物質の比旋光度は、物質固有の吸収（グルコースの場合 180 nm 付近）が始まる波長までは、波長が短いほど大きくなる。更に、タンパク質の凝集による濁度は、短い波長に対するほど大きくなる。従って、短い波長の光を用いて、旋光度、透過光強度、および散乱光強度を計測した方が、感度的には有利になる。

ただし、被検溶液が尿の場合、尿中に含まれるウロクローム等の色素により、波長が 500 nm 以下の光は吸収される。このため、波長が 500 nm より短い

光で計測すると、かえって精度が低下することがある。従って、波長が500 nm以上の光を用いて計測するのが実用的である。

【0071】

本実施の形態では、被検溶液と試薬の混入比率が49：1の例を示したが、混入後のm-ガロイル没食子酸およびクエン酸の濃度が例と同じであっても、混入比率が異なると、検量線も異なるため、この混入比率に応じた検量線を作成する必要がある。この際、被検溶液と試薬の混入比率が大きく、例えば1：1になると、同じタンパク質濃度の被検溶液に対する混濁は小さくなる。従って、単にタンパク質濃度に対する感度を向上させるには、混入比率を小さくすると有利になるので、混入後のm-ガロイル没食子酸の濃度を一定とした場合は、m-ガロイル没食子酸の濃度が高い試薬を利用する方が有利である。ここで、試薬が使用される家庭でありうる環境温度である0～40℃においても、析出や変質がないm-ガロイル没食子酸濃度は、7.8M ($\equiv 250\text{ g/dl}$) 以下であることが判明したので、m-ガロイル没食子酸水溶液試薬の濃度をこの濃度以下に設定した。

【0072】

また、本実施の形態で、被検溶液として使用したタンパク質濃度が0、2、5、15、60、100、250 mg/dlの各尿と上記m-ガロイル没食子酸-クエン酸水溶液試薬とを混入した後の、水溶液のpHは、4.5～5.8であった。なお、本実施の形態では、m-ガロイル没食子酸水溶液へ、酸としてクエン酸を添加して試薬とする例を示したが、被検溶液と試薬を混入した後の溶液のpHが1.5～5.8になるような酸であれば同様の効果が得られる。また、被検溶液に酸を混入しても、試薬混入後の溶液のpHが1.5～5.8になるようにすれば同様の効果が得られる。ただし、酸の種類や、被検溶液または／および試薬に混入する酸の量が異なれば、異なった検量線（図19の点線および実線に相当）が得られるため、そのつど新たな検量線（図19の点線および実線に相当）を作成する必要がある。上記のpH範囲以外では、全くタンパク質が凝集しないことも有り、安定した計測を実現することができないことが有り、上記pH範囲で計測することが実用上望ましい。

但し、被検溶液が尿の場合、この試薬または／および被検溶液に混入する酸として、フタル酸水素カリウム、酢酸、クエン酸、アスコルビン酸からなる群より選ぶと、適度な緩衝能が得やすく、低コストでかつ扱いやすく、更にリン酸塩、炭酸塩等の析出を誘発する可能性が低く、特に実用的である。

【0073】

なお、本実施の形態では、*m*-ガロイル没食子酸の試薬中の濃度が0.047 M ($\equiv 1.5 \text{ g/dl}$) の例を示した。被検溶液への混入比率が49:1のため、混入後の*m*-ガロイル没食子酸の濃度は $9.4 \times 10^{-4} \text{ M}$ ($\equiv 0.03 \text{ g/dl}$) となるが、これ以外の混入後濃度でも、 $5 \times 10^{-3} \sim 5 \text{ g/dl}$ の範囲にあれば、各混入後*m*-ガロイル没食子酸濃度に応じて検量線（図19の点線および実線に相当）を作成することにより、タンパク質濃度を計測できる。上記の範囲よりも、*m*-ガロイル没食子酸が低濃度の場合は、タンパク質が凝集しないこともあり、安定的な計測が難しい。また、上記の範囲よりも、*m*-ガロイル没食子酸が高濃度の場合は、凝集したタンパク質が急激に沈殿して、混濁が不均一になり、略平行光2の付近では濃度に応じて混濁がしないこともあり、安定的な計測が難しい。従って、上記濃度範囲で計測することが実用上望ましい。

【0074】

【発明の効果】

以上のように、本発明によれば、通常の家計における環境温度としてあり得る0～40℃程度までにおいても、タンパク質濃度の計測が可能になる。また、試薬に酸を混入することで、タンパク質濃度が高い（おおむね250～500 mg/dl以上）場合においても、タンパク質濃度が計測できる。更に、計測可能な被検溶液の濃度範囲を拡大することができ、同時に泡や浮遊粒子による計測の妨害も検知することができる。その結果、被検溶液中のタンパク質濃度を高精度で求めることができ、しかも、高信頼性で実用性が高い省力化された溶液濃度の測定、とりわけ尿中のタンパク質濃度の測定が可能になる。

また、被検溶液中のタンパク質とタンパク質以外の旋光性物質の双方の濃度を求めることもでき、特に被検溶液が尿の場合、尿タンパク濃度と尿糖値を同時に正確に測定できるので、尿検査工程を大幅に簡略化でき、その実用的効果は極め

て大きい。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の一実施の形態に用いた計測装置の概略構成を示す側面図である。

【図 2】

同装置の平面図である。

【図 3】

被検溶液のタンパク質濃度と散乱光強度との関係を示す図である。

【図 4】

被検溶液のタンパク質濃度と透過光強度との関係を示す図である。

【図 5】

本発明の他の実施の形態に用いた計測装置の概略構成を示す側面図である。

【図 6】

同装置の平面図である。

【図 7】

被検溶液の散乱光強度の変化を示す図である。

【図 8】

被検溶液の透過光強度の変化を示す図である。

【図 9】

被検溶液のタンパク質濃度と透過光強度の変化量との関係を示す図である。

【図 1 0】

被検溶液のタンパク質濃度と透過光強度の比との関係を示す図である。

【図 1 1】

本発明のさらに他の実施の形態に用いた計測装置の概略構成を示す側面図である。

【図 1 2】

被検溶液のタンパク質濃度と透過光強度の比との関係を示す図である。

【図 1 3】

被検溶液のタンパク質濃度と散乱光強度との関係を示す図である。

【図 1 4】

被検溶液のタンパク質濃度と透過光強度との関係を示す図である。

【図 1 5】

被検溶液の散乱光強度の変化を示す図である。

【図 1 6】

被検溶液の透過光強度の変化を示す図である。

【図 1 7】

被検溶液のタンパク質濃度と透過光強度の変化量との関係を示す図である。

【図 1 8】

被検溶液のタンパク質濃度と透過光強度の比との関係を示す図である。

【図 1 9】

被検溶液のタンパク質濃度と透過光強度の比との関係を示す図である。

【符号の説明】

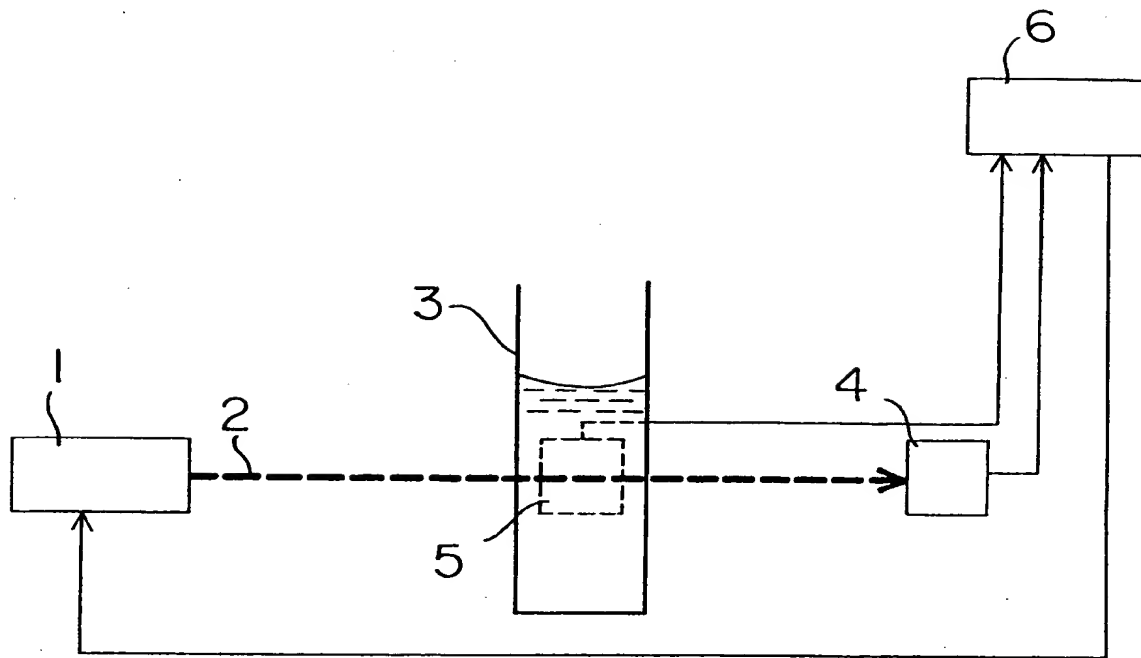
- 1、1 1 光源
- 2、1 2 略平行光
- 3、1 3 サンプルセル
- 4、1 9 透過光を検知する光センサー
- 5 散乱光を検知する光センサー
- 6、2 3 コンピューター
- 7 散乱光
- 8、1 5 混入口
- 9、2 4 ピペッタ
- 1 7 偏光子
- 1 4 ソレノイドコイル
- 1 6 通気口
- 1 8 検光子
- 2 0 コイルドライバー
- 2 1 信号発生器
- 2 2 ロックインアンプ

特 2 0 0 0 - 1 2 4 9 0 4

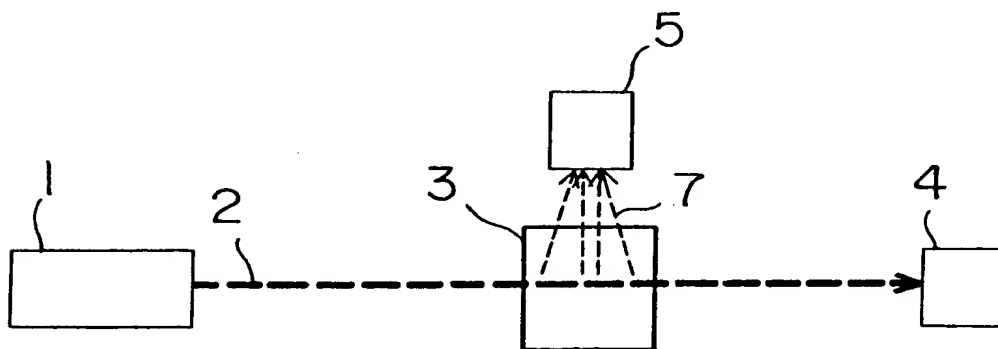
2 5 チューブ

【書類名】 図面

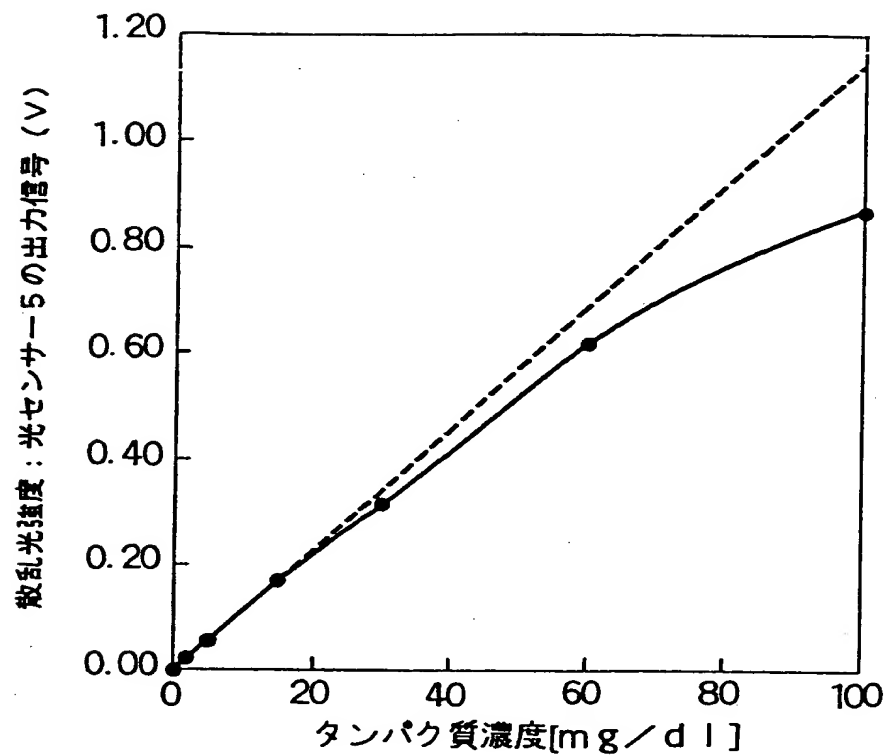
【図 1】



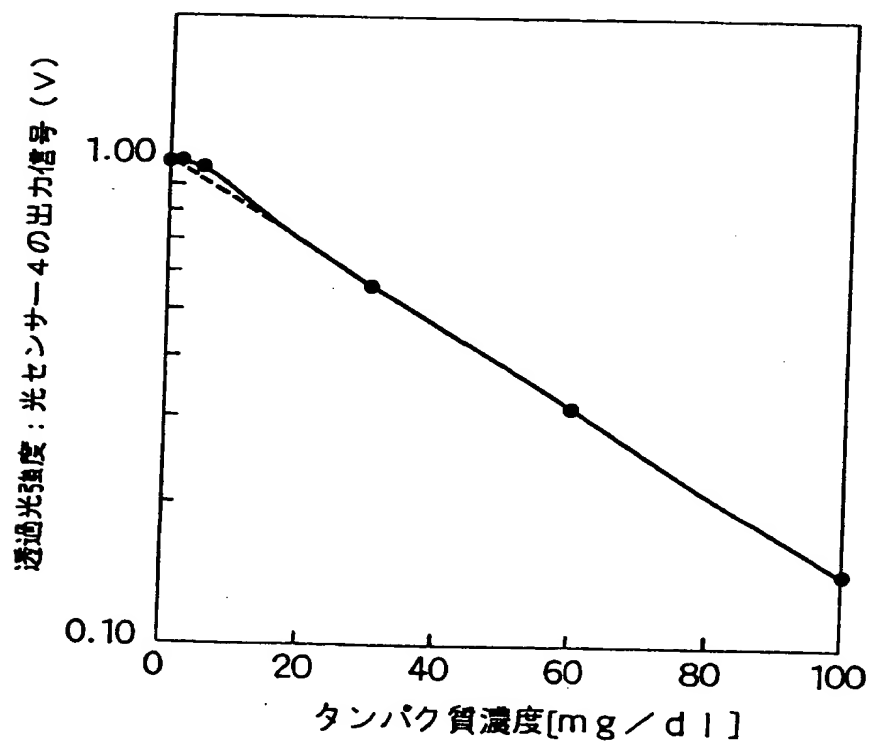
【図 2】



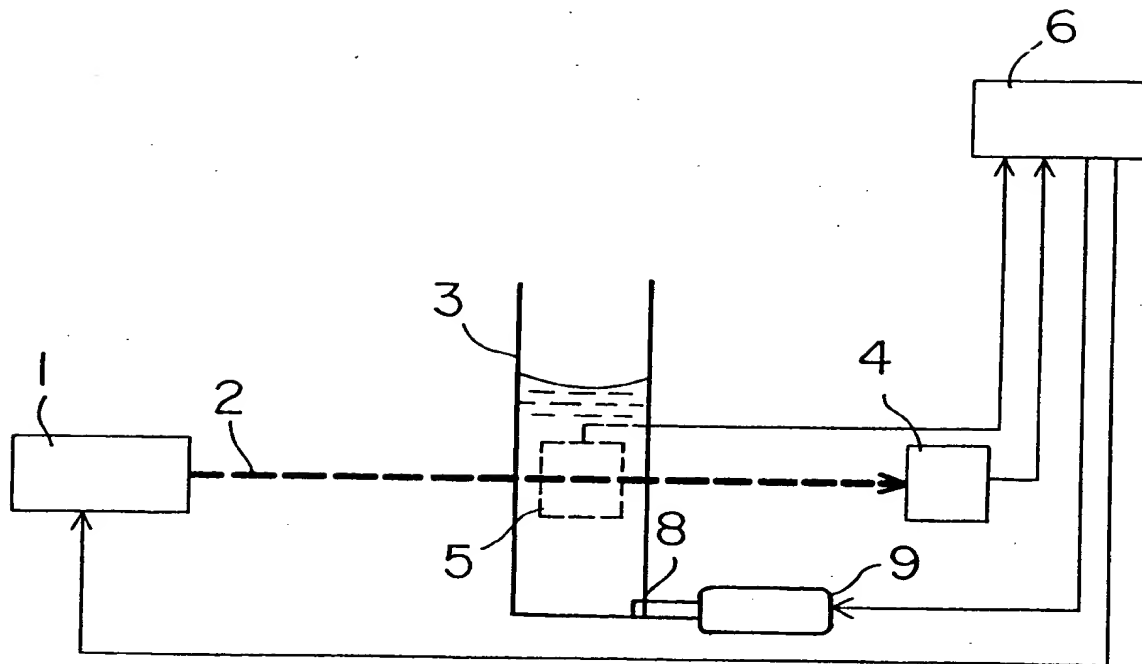
【図 3】



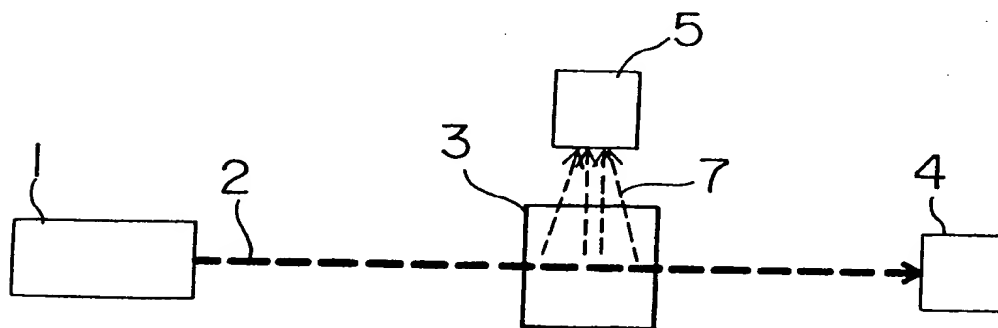
【図 4】



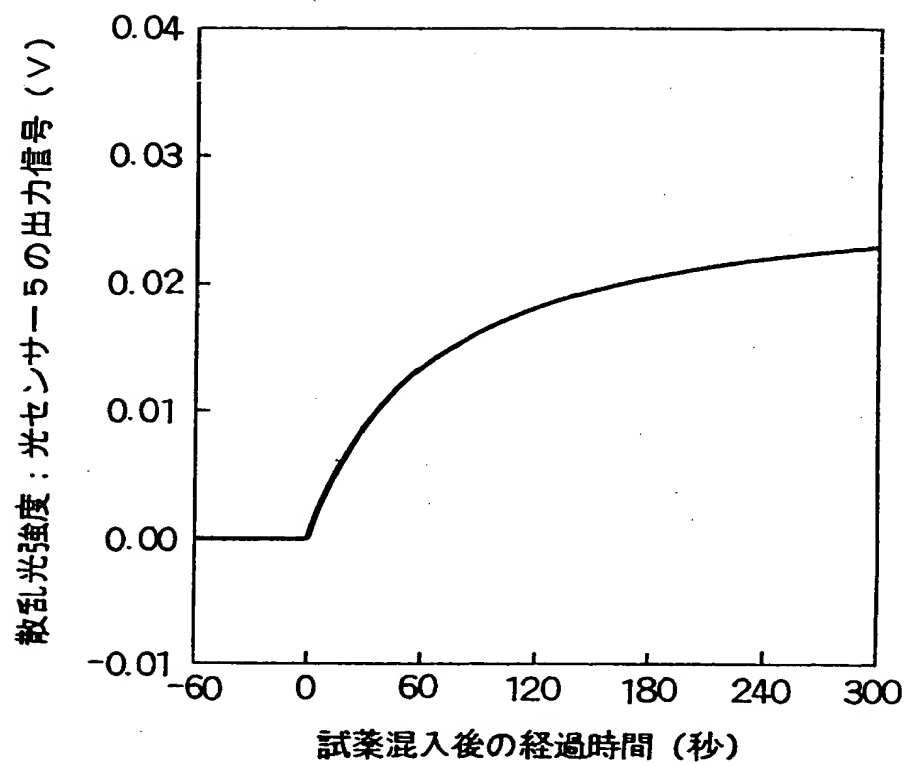
【図 5】



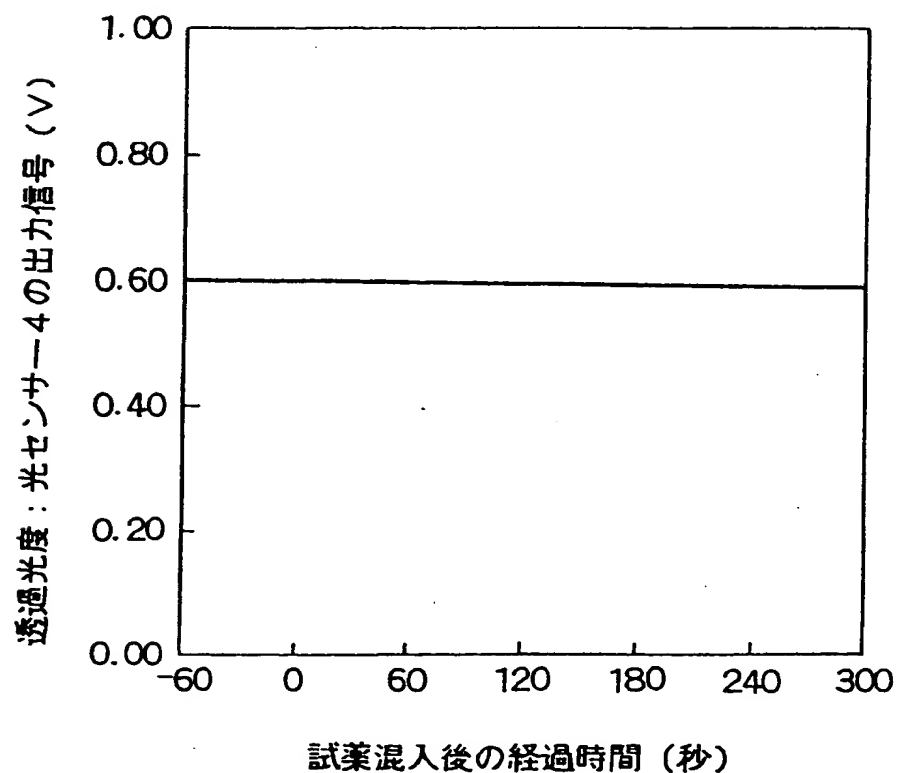
【図 6】



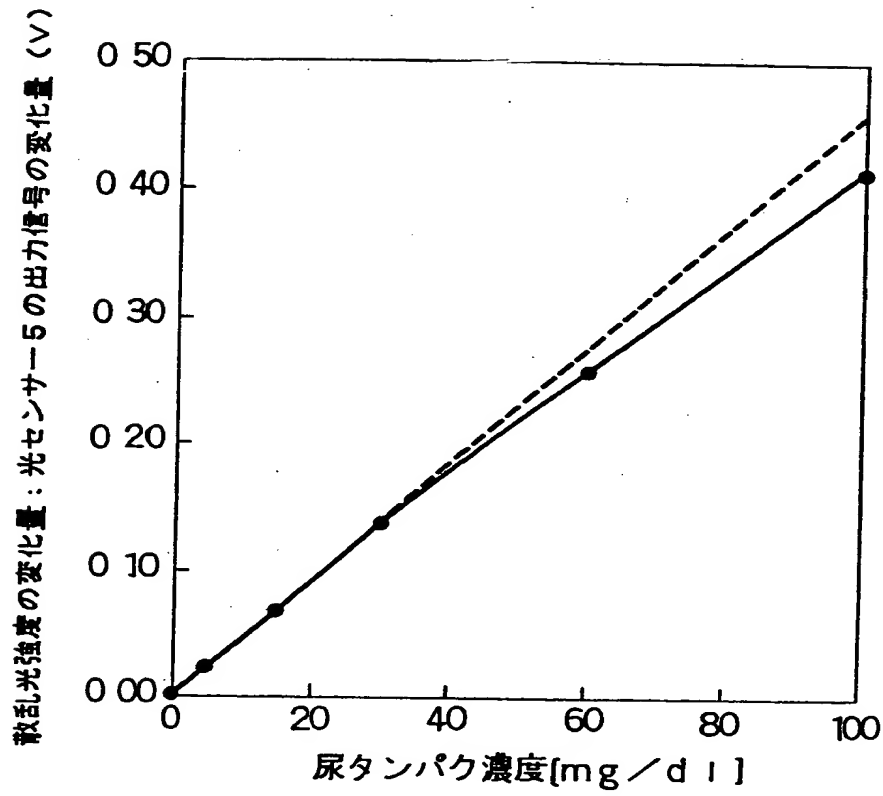
【図 7】



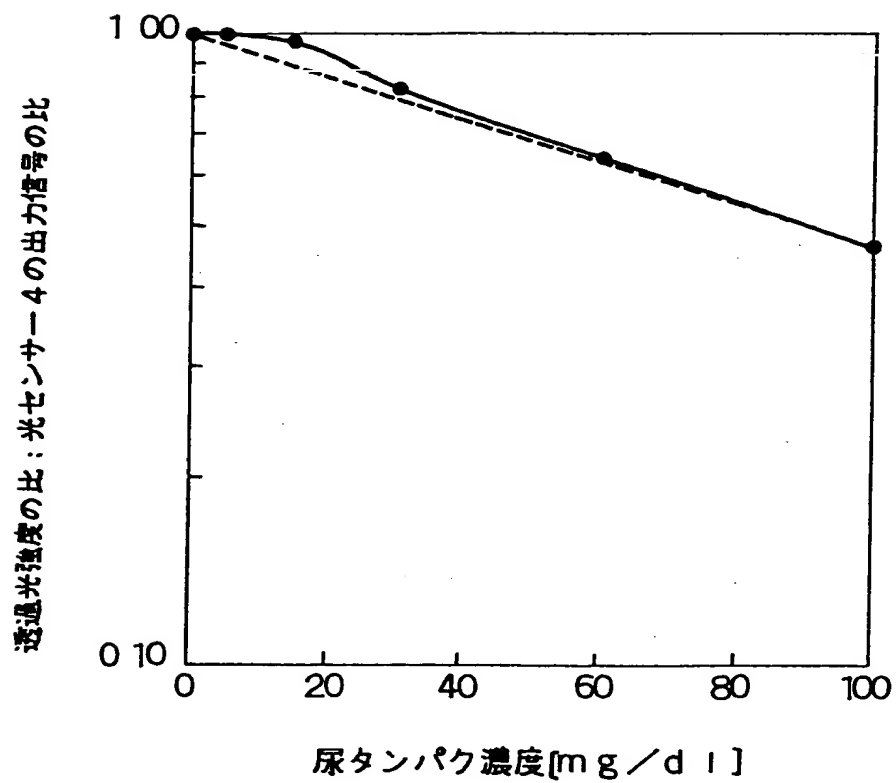
【図 8】



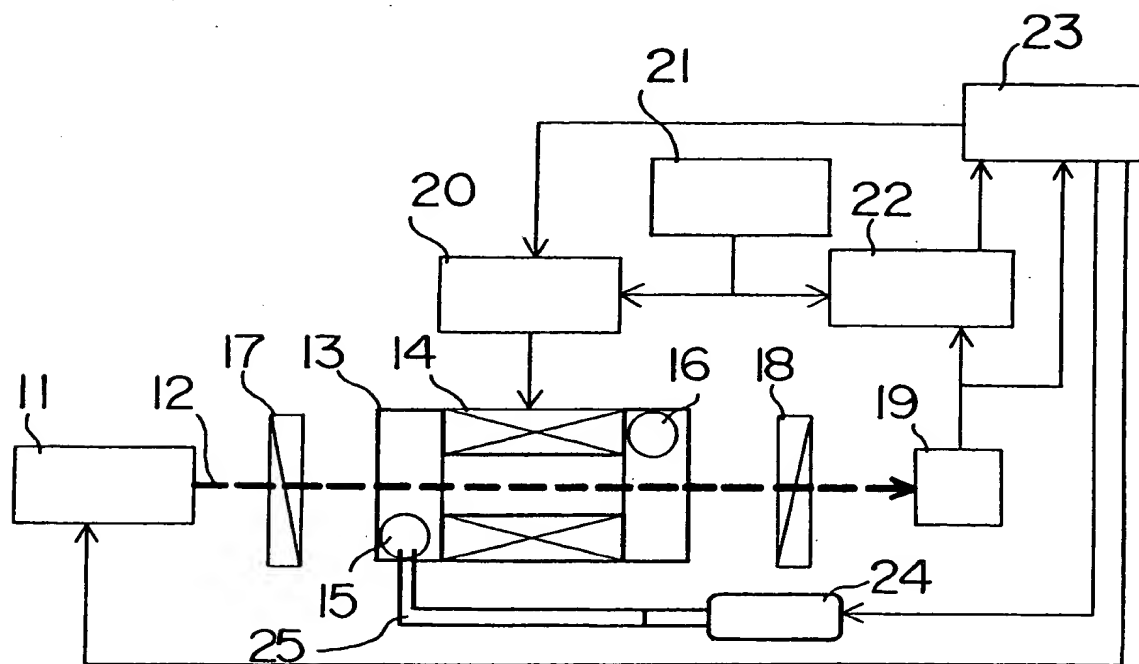
【図 9】



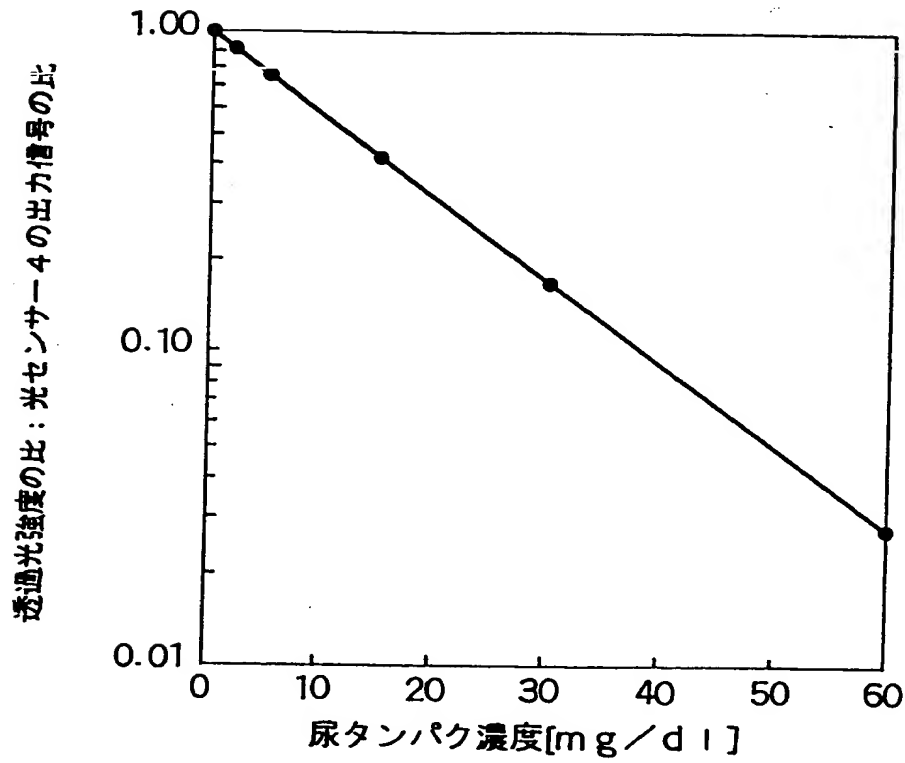
【図 10】



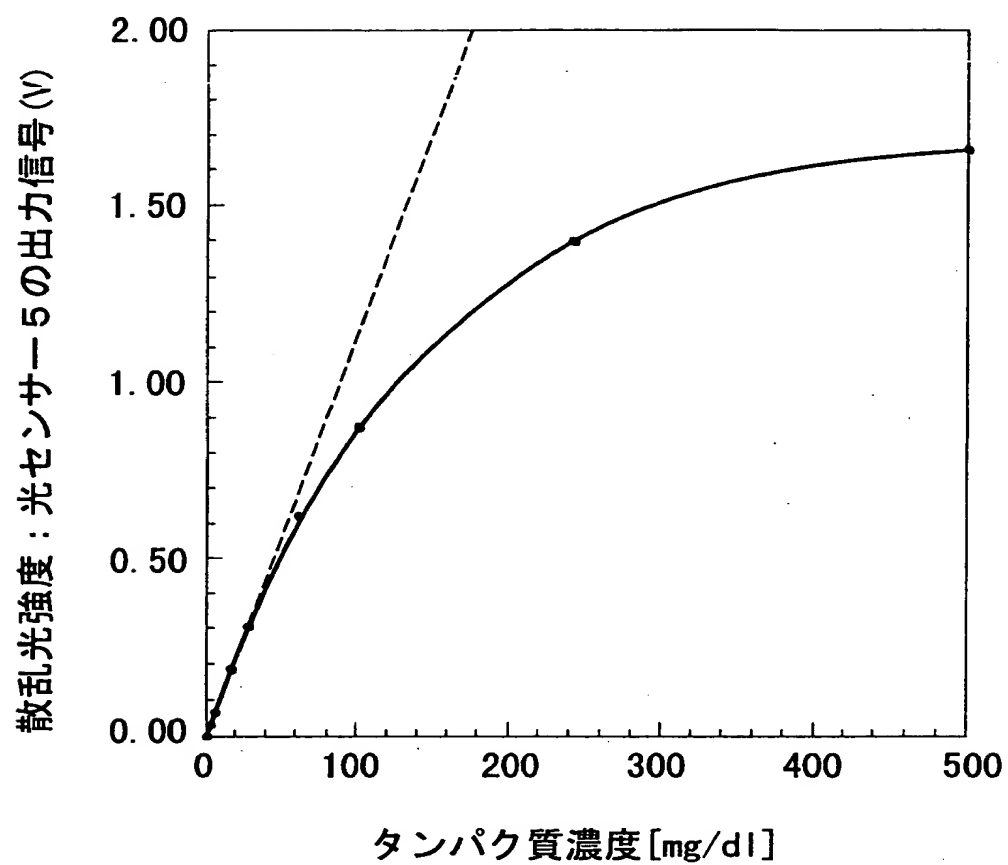
【図 11】



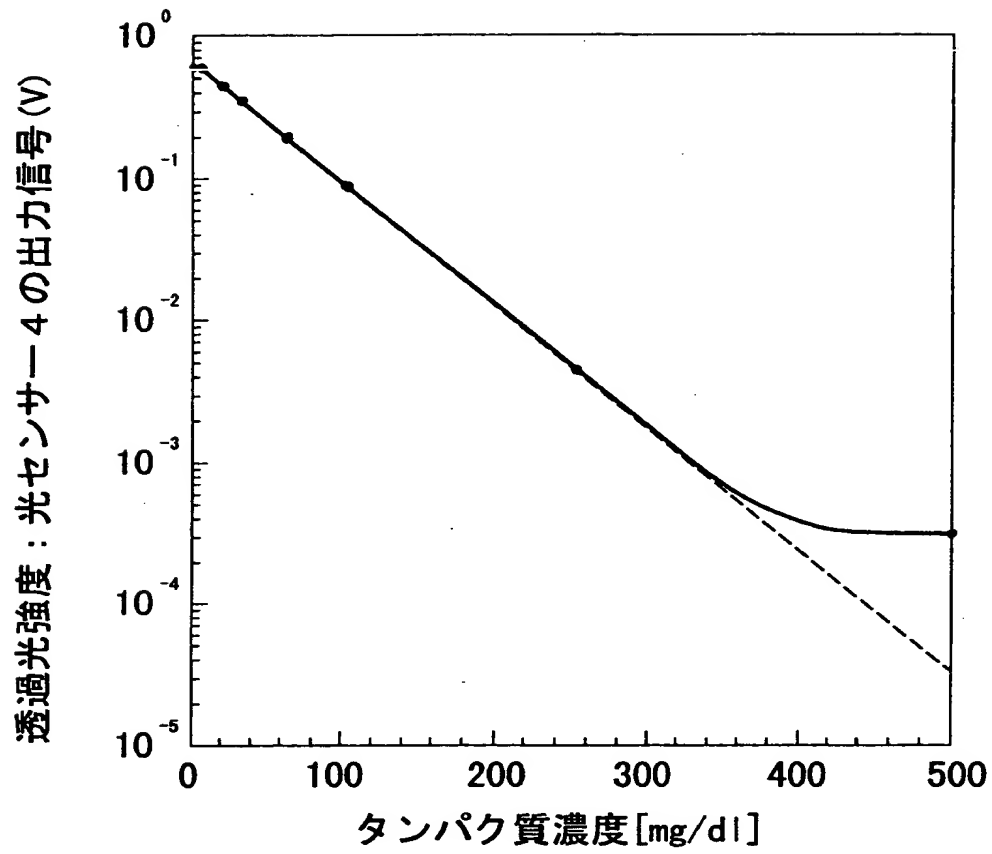
【図 12】



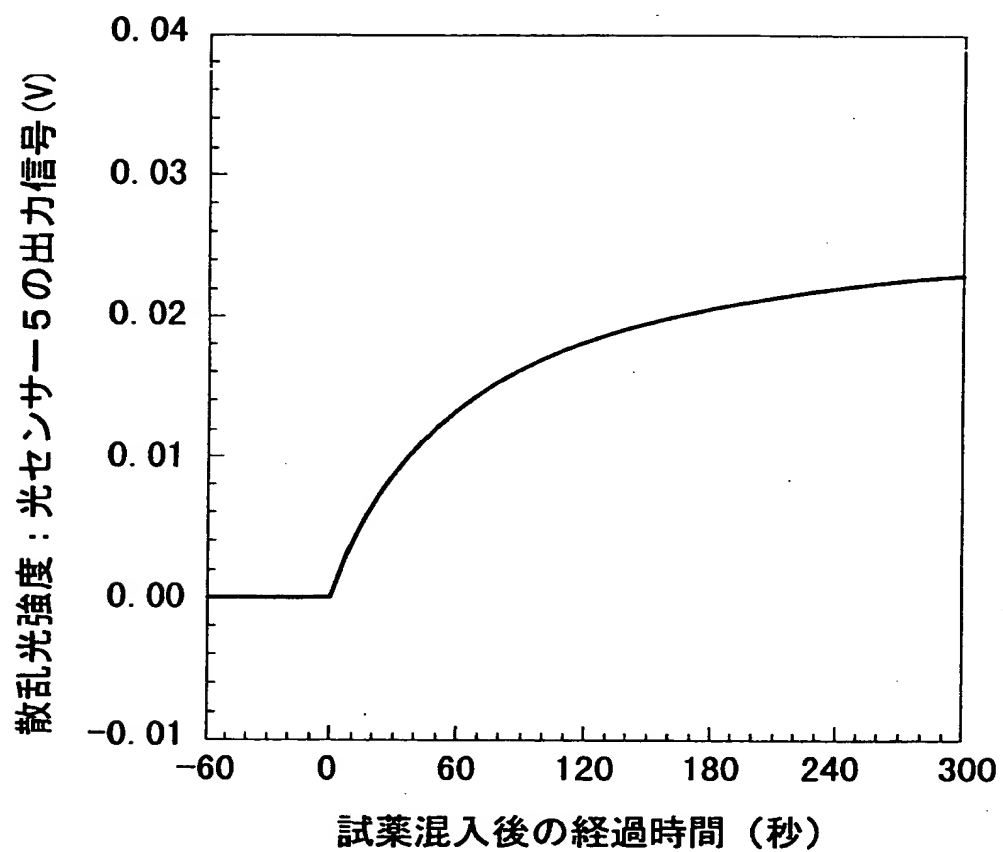
【図 13】



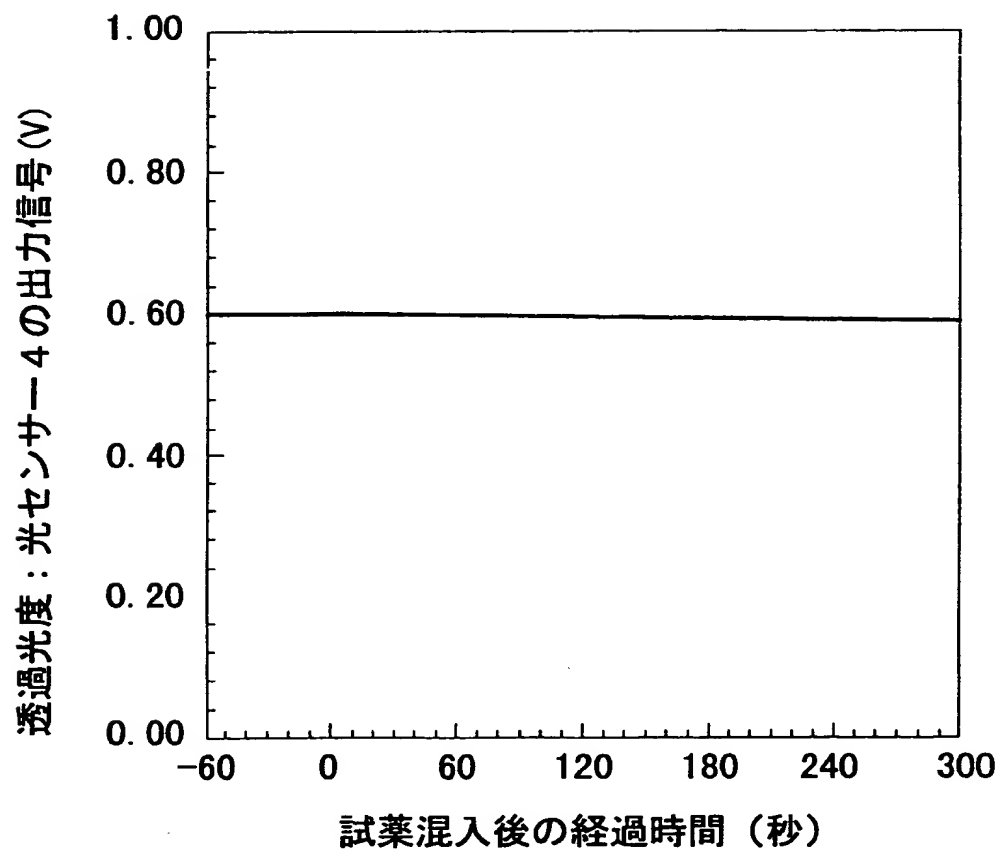
【図 1 4】



【図 1 5】

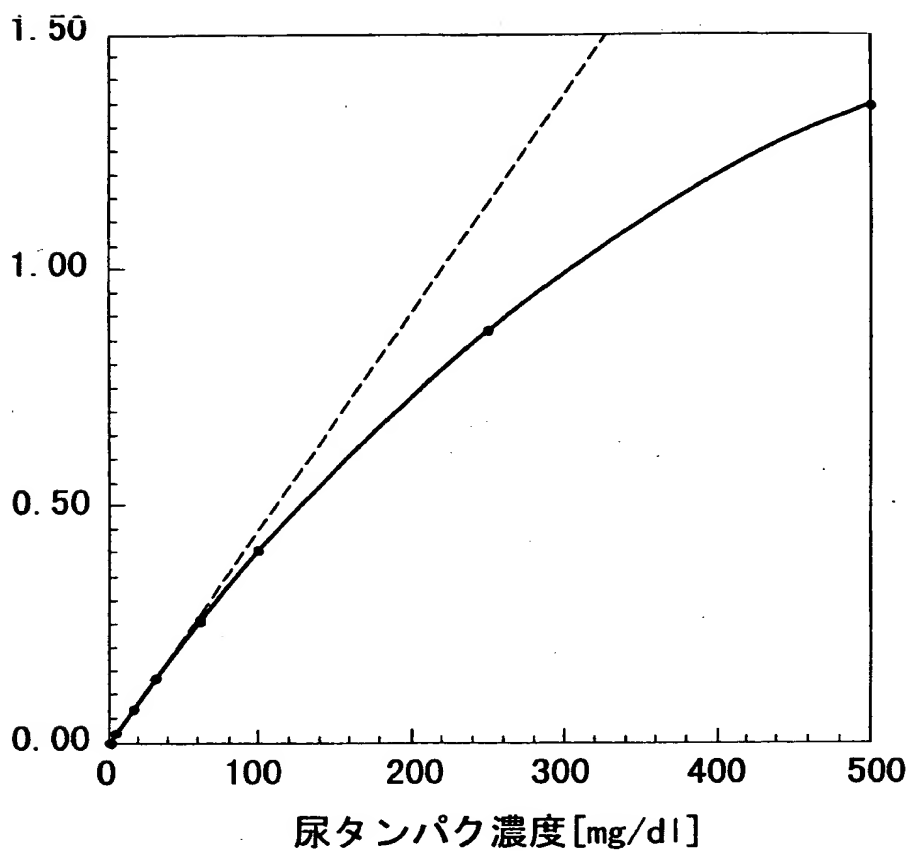


【図 1 6】

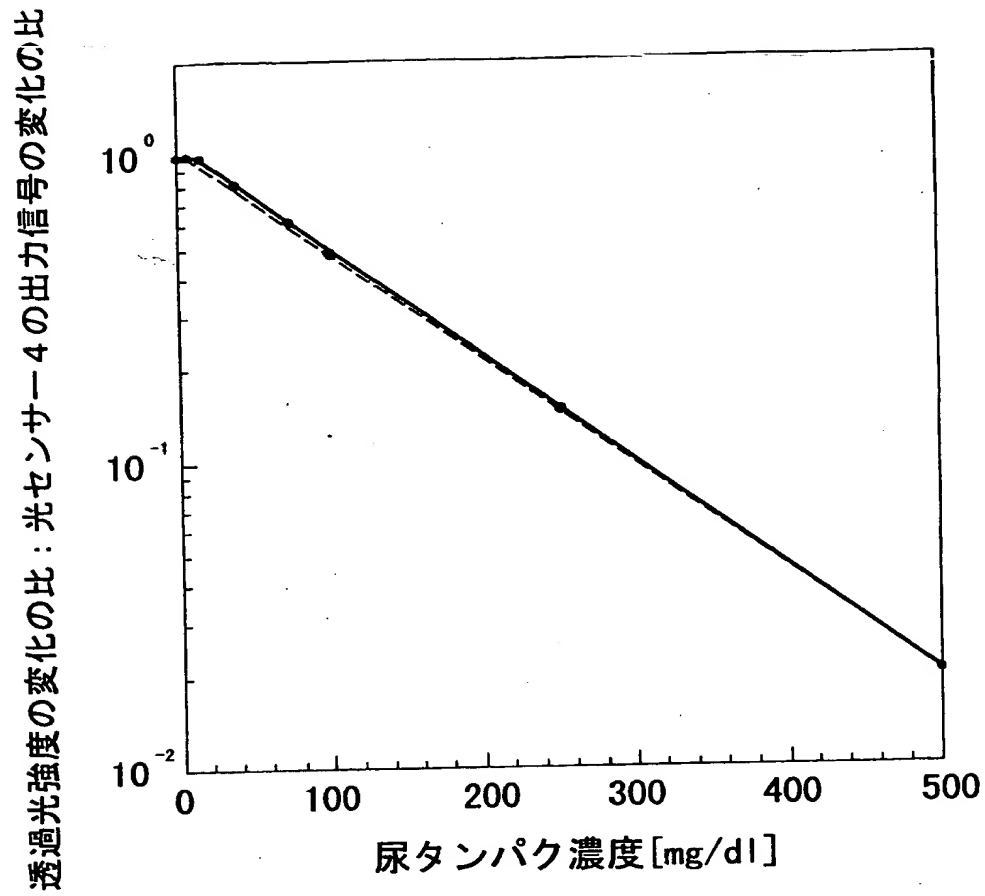


【図 17】

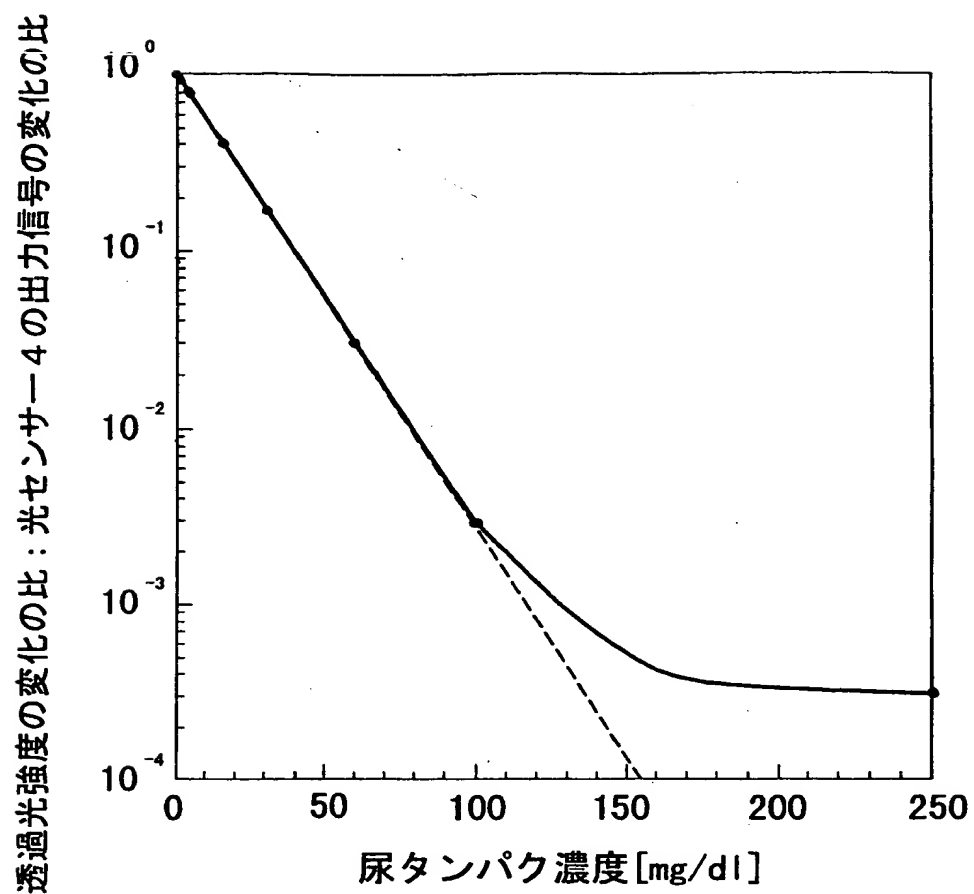
散乱光強度の変化量：光センサー5の出力信号の変化量 (V)



【図 18】



【図19】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 家庭でありうる 25℃以上の環境温度においても、安定的にタンパク質濃度を計測し、さらに計測濃度範囲の拡大と浮遊粒子等の妨害を防止することを目的とする。

【解決手段】 タンニン、タンニン酸、m-ガロイル没食子酸を含む溶液に酸を混入した試薬を使用する。この試薬を被検溶液に混入することで、被検溶液を混濁させ、透過光または及び散乱光強度を計測し、タンパク質濃度を計測する。また、旋光度を計測後にタンパク質濃度を計測する溶液濃度計測方法及び尿検査方法。

【選択図】 図 1

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2000-124904
受付番号	50000524534
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0090
作成日	平成12年 4月28日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成12年 4月25日
-------	-------------

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005821]

1. 変更年月日	1990年 8月28日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府門真市大字門真1006番地
氏 名	松下電器産業株式会社